Aus der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik
von Hormon- und Stoffwechselstörungen
Direktor: Professor Dr. D. Gupta
der Kinderklinik der Universität Tübingen

EINE VERGLEICHENDE STUDIE ÜBER DIE BIOLOGISCHE AKTIVITÄT VON SYNTHETISCHEM TRH UND ZWEIER ANALOGA AN RATTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Helmut Roland Hofmann
aus
Nehdorf Kreis Ansbach

1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523702_0084

Aus der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik
von Hormon- und Stoffwechselstörungen
Direktor: Professor Dr. D. Gupta
der Kinderklinik der Universität Tübingen

EINE VERGLEICHENDE STUDIE ÜBER DIE BIOLOGISCHE AKTIVITÄT VON SYNTHETISCHEM TRH UND ZWEIER ANALOGA AN RATTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Helmut Roland Hofmann
aus
Nehdorf Kreis Ansbach

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. H.-E. Hoffmeister
Berichterstatter: Professor Dr. D. Gupta

Fotodruck H. Resch · Georgstraße 50 · 7402 Kirchentellinsfurt

Meiner Mutter †

Meinem Vater

Meiner Frau

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL	5
2.1	Versuchstiere	5
2.2	Thyreotropin releasing Hormone und Analoga	5
2.3	Apparaturen	5
2.4	Chemikalien und Reagenzien	5
2.5	Puffer, Lösungen und Substanzen	6
2.6	Antikörper	6
2.7	Referenz-Substanz	6
2.8	Standardverdünnungen	6
2.9	Jodierungssubstanz	7
2.1o	Abkürzungen	7
3	METHODE	8
3.1	Auswahl der Ratten und deren Haltung	8
3.2	Ablauf der Tierversuche	9
3.2.1	Injektionsschema	9
3.2.2	Injektion der Ratten	9
3.2.3	Decapitation und Blutgewinnung	1o
3.2.4	Skizze zum Versuchsablauf	11
3.2.5	Serumgewinnung	11
3.3	Kontrollgruppe	11
3.4	Radioimmunologische Bestimmung des Thyreoidea stimulierendes Hormon-Spiegel im Serum der Ratten	12
3.4.1	Allgemeines zum Radioimmunoassay	12
3.4.2	Jodierung des Ratten-TSH	13
3.4.2.1	Vorbereitungen	13
3.4.2.2	Jodierungsschema	14
3.4.2.3	Nachreinigungen	15
3.4.2.4	Messung der Radioaktivität	16
3.4.2.5	Jodierungsberechnungen	16

Seite

3.4.3 Durchführung des Radioimmunoassay 18
3.4.3.1 Pipettierschema 18
3.4.3.2 Ansatz der Serumproben 19
3.4.3.3 Ansatz zur Bestimmung der Totalradioaktivität 19
3.4.3.4 Ansatz zur Bestimmung der Bindungsfähigkeit des radioaktiv markierten Hormons mit dem spezifischen Antikörper (B_o-Bindung) 2o
3.4.3.5 Ansatz zur Bestimmung der unspezifischen Bindung 2o
3.4.3.6 Ansatz zur Erstellung der Standardkurve 2o
3.4.4 Standardkurve 21
3.4.4.1 Empfindlichkeit der Standardkurve 22

4 ERGEBNISSE 25
4.1 Berechnung der Ergebnisse 25
4.2 Darstellung der Ergebnisse 25
4.3 L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-prolinamid 26
4.4 L-pyroglutamyl-D-histidyl-L-prolinamid 31
4.5 L-pyroglutamyl-L-phenylalanin-L-prolinamid 37
4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse 42

5 DISKUSSION 43
5.1 Methode 43
5.2 Synthetisches TRH (L-pyroglutamly-L-histidyl-L-prolinamid) 44
5.3 L-pyroglutamyl-D-histidyl-L-prolinamid und L-pyroglutamyl-L-phenylalanin-L-prolinamid 45

6 ZUSAMMENFASSUNG 47

7 LITERATUR 48

1 EINLEITUNG

In den letzten Jahrzehnten wurde eindeutig bewiesen, daß der Hypothalamus die Adenohypophyse (Hypophysenvorderlappen) kontrolliert.

Einige Autoren (HOUSSAY et al. 1935, WISLOCKI und KING 1936, WISLOCKI 1937 und 1938) zeigten, daß bei Kröten, Katzen, Rhesusaffen und beim Menschen die Blutflußrichtung im hypothalamisch-hypophysären Pfortaderkreislauf vom Hypothalamus zum Hypophysenvorderlappen geht.

Einige Jahre später (GREEN und HARRIS 1949) wurde auch an lebenden Ratten beobachtet, daß das Blut in den Pfortadergefäßen vom Hypothalamus zum Hypophysenvorderlappen fließt. Bereits 1955 nahm HARRIS an, daß der Hypothalamus die Drüsenfunktion des Hypophysenvorderlappens kontrolliert, indem er regulierende Bestandteile ins Pfortaderblut ausschüttet.

Während der vergangenen Jahre sind Nachprüfungen der hypothalamischen Kontrolle über die Sekretion von Hypophysenhormonen gemacht worden (GUILLEMIN 1964, MCCANN und DHARIWAL 1966, GANONG und LORENZEN 1967, SCHALLY et al. 1968, MCCANN und PORTER 1969). Diese Untersuchungen bewiesen, daß die Produktion und Ausschüttung von glandotropen Hypophysenvorderlappenhormonen durch sogenannte releasing- und inhibiting Faktoren oder Hormonen geregelt wird. Eines dieser releasing Hormone ist das Thyreotropin releasing Hormone (TRH), das in der thyreotropen Region des Hypothalamus enzymatisch synthetisiert wird.

Der Beweis dafür, daß die Thyreoidea stimulierendes Hormon (TSH)-Ausschüttung durch neurosekretorische Stoffe des Hypothalamus kontrolliert wird, wurde von verschiedenen Autoren (GREER 1957, D'ANGELO 1963, REICHLIN 1963 und HARRIS 1955) erbracht.

Die erste Demonstration einer Substanz im hypothalamischen Gewebe mit TRH-Fähigkeit wurde schon 1962 gleichzeitig von GUILLEMIN et al. und SCHREIBER et al. gemacht.

Gereinigtes TRH ist gewonnen worden vom Schwein (SCHALLY et al. 1966a), vom Schaf (GUILLEMIN et al. 1966), von der Kuh (SCHALLY et al. 1966b) und vom Menschen (BOWERS et al. 1965, SCHALLY et al. 1967). Seine biologische Aktivität ist in zahlreichen in vitro Versuchen (GUILLEMIN 1965, 1967, GUILLEMIN et al. 1965, SCHALLY und REDDING 1967, MITTLER et al. 1969) und in zahlreichen in vivo Versuchen (GUILLEMIN 1965, 1967, GUILLEMIN et al. 1965, 1966, SCHALLY et al. 1966b, 1968, BOWERS et al. 1967) bewiesen worden.

Die Strukturformel des Schweine-TRH wurde als L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-prolinamid aufgeklärt (FOLKERS et al. 1969, BØLER et al. 1969, SCHALLY et al. 1969, ENZMANN et al. 1971). Es wurde angenommen (BOWERS et al. 197o, SCHALLY et al. 197oa), daß das TRH von einigen anderen Säugetierarten vielleicht die gleiche chemische Struktur besitzt.

In vitro und in vivo Versuche haben gezeigt, daß TRH vom Menschen in Prüfsystemen, in denen Mäuse und Ratten als Versuchstiere dienten, TSH freisetzt (BOWERS et al. 1965, SCHALLY et al. 197ob).

Es wurde auch gezeigt (BOWERS et al. 1968), daß hochgereinigtes TRH vom Schwein beim Menschen einen signifikanten Anstieg des TSH-Spiegels im Plasma hervorbringt, wenn es intravenös injiziert wird.

Einige Zeit später wurde in einigen Laboratorien synthetisches TRH hergestellt (BØLER et al. 1969, BURGUS et al. 1969, NAIR et al. 197o, GILLESEN et al. 197o, BAUGH et al. 197o, FLOURET 197o, INOUYE et al. 1971). Die biologische Aktivität dieses synthetisch hergestellten TRH war der vom Schwein gewonnenen (BOWERS et al. 197o) und der

vom Rind gewonnenen (BURGUS et al. 1970) TRH-Aktivität ähnlich.

Nach der Synthese von L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-prolinamid gelang es nun auch, TRH-ähnliche Moleküle - sogenannte Analoga - herzustellen und deren biologische Aktivität zu messen (GUPTA und VOELTER 1974, ZECH et al. 1974a, 1974b, VOELTER et al. 1974).

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine tierexperimentelle Studie, die an der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik von Hormon- und Stoffwechselstörungen der Universitätskinderklinik Tübingen durchgeführt wurde.

Als Versuchstiere dienten Ratten, bei denen nach intraperitonealer Injektion verschieden hoher Dosen von synthetischem TRH und zweier Analoga der TSH-Spiegel im Serum mit Hilfe einer radioimmunologischen Bestimmung gemessen wurde.

Die Fragestellung dieser Arbeit lautete:

1. Hat L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-proliamid (L-L-L-TRH) eine dosisabhängige Wirkung auf die Ausschüttung von TSH?

2. Wie groß ist die biologische Aktivität von L-pyroglutamyl-D-histidyl-L-prolinamid und L-pyroglutamyl-L-phenylalanin-L-prolinamid (L-D-L-TRH und L-LPhe-L-TRH)?

2 MATERIAL

2.1 Versuchstiere

Albinoratten, weiblich, Stamm Whistar, Fa. Ivanovas, Kisslegg

2.2 Thyreotropin releasing Hormone und Analoga

L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-prolinamid
L-pyroglutamyl-D-histidyl-L-prolinamid
L-pyroglutamyl-L-phenylalanin-L-prolinamid
Diese drei Tripeptide wurden von der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik von Hormon- und Stoffwechselstörungen der Universitätskinderklinik Tübingen zur Verfügung gestellt.

2.3 Apparaturen

Zentrifuge, Typ UJ2, Fa. Christ, Osterode
Kühlzentrifuge, Typ UJ3S, Fa. Christ, Osterode
Chromatographiesäulen mit Fritte, Fa. Quickfitt, England
Auto-Gamma-Scintillations-Spectrometer, Typ 516o, Fa. Hewlett u. Packard, Frankfurt

2.4 Chemikalien und Reagenzien

Chloroform,	Nr. 2445 Fa. Merck, Darmstadt
Natriummetabisulfit, $Na_2S_2O_5$	Nr. 6357 Fa. Merck, Darmstadt
Natriumazid	Nr. 6688 Fa. Merck, Darmstadt
Chloramin T (Trihydrat)	Nr. 2426 Fa. Merck, Darmstadt
Titriplex III (EDTA, Dihydrat)	Nr. 8418 Fa. Merck, Darmstadt
NaH_2PO_4	Nr. 6345 Fa. Merck, Darmstadt
Na_2HPO_4	Nr. 658o Fa. Merck, Darmstadt
NaCl	Nr. 64o4 Fa. Merck, Darmstadt
Kaliumjodid, neutral	Nr. 5o43 Fa. Merck, Darmstadt

2.5 Puffer, Lösungen und Substanzen

Stammlösung a: 7,8g NaH_2PO_4 in 1ooml H_2O = o,5M
Stammlösung b:17,8g Na_2HPO_4 in 2ooml H_2O = o,5M
Puffer 1: 19,6ml Stammlösung a und 8o,4 ml Stammlösung b, pH 7,4
Puffer 2: 1,72ml Stammlösung a und 18,28ml Stammlösung b und 1g Natriumazid und 8,77g NaCl ad 1ooo ml H_2O, pH 7,8
Puffer 3: wie Puffer 2, jedoch ohne Natriumazid
Vetren, Heparin-Natrium, Fa. Promonta, Hamburg
Bovines Serumalbumin (BSA), Behringwerke, Marburg
Isotone Kochsalzlösung Biotest, Biotest Serum-Institut, Frankfurt
Sephadex G 75, Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden
Sephadex G 1oo, Fa. Pharamcia, Uppsala, Schweden
J^{125}, Fa. Amersham-Buchler, Braunschweig
Vermehrungsserum (Kaninchenserum, nicht gereinigt), Universitätskinderklinik Tübingen

2.6 Antikörper

NIAMD-Anti-Rat-TSH Serum-2 (spezifischer Antikörper), National Institute of Arthritis and Metabolic Disease, Bethesda, USA
Anti-Rabbit-Precipitating Serum donkey for RIA, (unspezifischer Antikörper) Wellcome-Research Laboratories, Beckenham, England

2.7 Referenz-Substanz

NIAMD-Rat-TSH-RP-1, National Institute of Arthritis and Metabolic Disease, Bethesda, USA

2.8 Standardverdünnungen

Die Standardhormonkonzentrationen für den Ansatz zur Erstellung der Standardkurve erfolgte durch Verdünnung der

Referenz-Substanz mit 1 % BSA-Puffer 2.

2.9 Jodierungssubstanz

NIAMD-Rat-TSH-I-1, National Institute of Arthritis and Metabolic Disease, Bethesda, USA.

2.1o Abkürzungen

Im Text dieser Arbeit werden folgende Abkürzungen verwendet:

AG	=Antigen
AK	=Antikörper
bg	=Background (Hintergrundstrahlung)
B_o	=Standardleerwert
B	=antikörpergebundene Impulse
L-L-L-TRH	=L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-prolinamid
L-D-L-TRH	=L-pyroglutamyl-D-histidyl-L-prolinamid
L-LPhe-L-TRH	=L-pyroglutamyl-L-phenylalanin-L-prolinamid
O	=Unspezifische Bindung (Reagenzienleerwert)
r	=Regression
r^2	=Regression^2
RIA	=Radioimmunoassay
s	=Standardabweichung
S	=Serum
St	=Standardhormon
S_x	=unmarkiertes (kaltes) Hormon
S_{xm}	=radioaktiv markiertes Hormon
T	=Gesamtradioaktivität pro Probe
TRH	=Thyreotropin releasing Hormone
TSH	=Thyreoidea stimulierendes Hormon, Thyreotropin
ug	=Gamma=$1o^{-6}$g
$\bar{x}$	=Mittelwert

3 METHODE

Die Methode zur Bestimmung der biologischen Aktivität von TRH und zweier TRH-Analoga gliederte sich in folgende drei Schritte:

I) Injektion der Ratten mit verschieden hohen Dosen von TRH und der beiden TRH-Analoga

II) Blutgewinnung durch Decapitation der Ratten nach verschieden langen Einwirkungszeiten des injizierten TRH bzw. der TRH-Analoga

III) Quantitative Bestimmung des TSH-Gehaltes im Serum mit Hilfe eines Radioimmunoassay

3.1 Auswahl der Ratten und deren Haltung

Es wurden ausschließlich weibliche Albinoratten vom Stamm Whistar verwendet, deren Gewicht bei Anlieferung 2oo ± 1o g betrug. Die Haltung erfolgte im Tierstall der Universitätskinderklinik Tübingen in Gemeinschaftskäfigen aus Draht. In jedem Drahtkäfig wurden maximal vier Tiere gehalten. Die Fütterung erfolgte mit Trockenfutter und Leitungswasser, wobei beides stets im Überschuß vorhanden war. Die Temperatur im Tierstall betrug konstant 2o°C und der Tag/Nacht-Rhythmus verlief im Verhältnis von 12 zu 12 Stunden.

Die Reinigung der Käfige erfolgte in dreitägigen Abständen durch Wechseln der Sägespäne.

Da die Ratten eine längere Bahn- und Autofahrt hinter sich hatten, wurden sie erst nach einer Adaptionszeit von acht Tagen zu Versuchszwecken herangezogen.

3.2 Ablauf der Tierversuche

3.2.1 Injektionsschema

Injiziertes Molekül / Dosierung	L-L-L-TRH	L-D-L-TRH	L-LPhe-L-TRH
1oooong	4 Ratten	4 Ratten	4 Ratten
2ooong	4 Ratten	4 Ratten	4 Ratten
1ooong	4 Ratten	4 Ratten	4 Ratten
1oong	4 Ratten	4 Ratten	4 Ratten

Da von jeder Gruppe (gleiches Molekül und gleiche Dosierung) der TSH-Gehalt im Serum nach Einwirkungszeiten von 1o, 2o, 3o und 6o min bestimmt wurde, waren für diese Versuchreihe 192 Ratten notwendig.

3.2.2 Injektion der Ratten

Nach Anhebung des Käfigdeckels wurden die Ratten einzeln und nacheinander vom Tierstall über einen kleinen Gang in den sogenannten Tieroperationsraum getragen. Die Ratten wurden dabei dauernd mit unter dem Maul verschränkten Vorderpfoten gehalten, so daß sie keine Bißmöglichkeiten hatten. Nachdem sowohl die Tür zum Tierstall als auch die Tür zum Tieroperationsraum geschlossen war, wurde den Ratten die entsprechende Menge L-L-L-TRH oder L-D-L-TRH oder L-LPhe-L-TRH intraperitoneal injiziert. Danach erfolgte die Markierung der Ratten mit einem Filzschreiber. Sofort darauf wurden die Ratten wieder in ihren ursprünglichen Käfig zurückgetragen,und daran anschließend wurden die laufende Nummer, die Art des

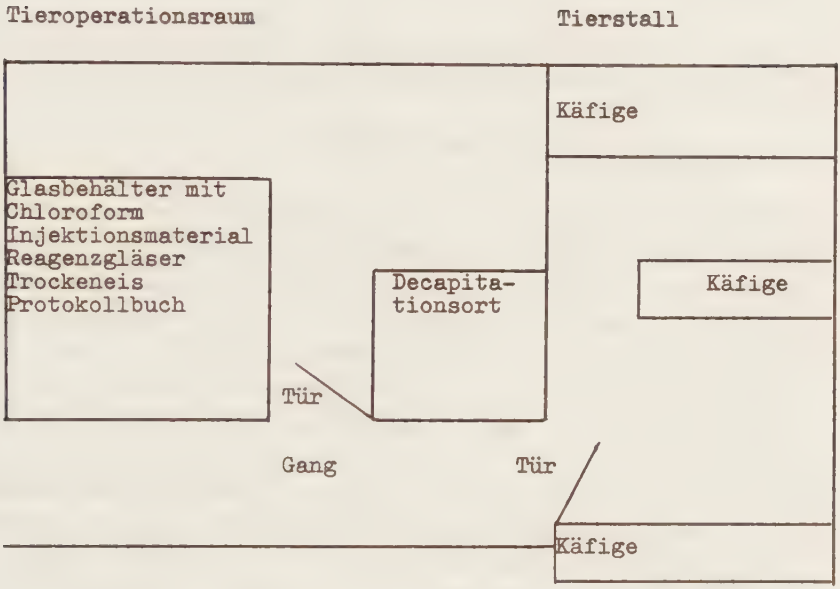
injizierten Moleküls, die injizierte Menge, der Zeitpunkt der Injektion, die Art der Markierung und die Nummer des Käfigs protokolliert.

3.2.3 Decapitation und Blutgewinnung

Nach einer Einwirkungszeit von 1o, 2o, 3o oder 6o min wurden die Ratten auf die gleiche Weise wie bei der vorangegangenen intraperitonealen Injektion in den Tieroperationsraum getragen und dort in einen Glasbehälter gelegt, auf dessen Grund sich etwas Chloroform befand. Nach 3o Sekunden wurden die bewußtlosen Tiere herausgenommen und sofort mit Hilfe einer Schere decapitiert. Das aus dem Rumpf austretende Blut wurde über einen Trichter in ein numeriertes Reagenzglas geleitet, in dem sich eine Spatelspitze Vetren befand, wodurch die Blutgerinnung verhindert wurde. Die Kühlung der mit Blut gefüllten Reagenzgläser erfolgte mit Trockeneis. Vor Durchführung einer neuen Decapitation wurden die Schere und der Trichter mit physiologischer Kochsalzlösung gereinigt und getrocknet.

Es wurden pro Versuchstag nie mehr als 16 Tiere getötet, um die Möglichkeit auszuschließen, daß es sonst trotz aller Vorsichtsmaßnahmen zu einer Verfälschung der Ergebnisse gekommen wäre.

3.2.4 Skizze zum Versuchsablauf



3.2.5 Serumgewinnung

Die mit laufenden Nummern versehenen Reagenzgläser wurden sofort nach Beendigung einer Versuchsserie (maximal 16 Tiere) in die Zentrifuge eingebracht und dort bei 3ooo Umdrehungen pro Minute 2o Minuten lang zentrifugiert. Das so gewonnene Serum wurde mittels einer Eppendorfpipette in Fraktionen von je einem Milliliter in Schnappdeckelgläschen pipettiert und sofort tiefgefroren.

3.3 Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe dienten 15 Ratten. Bei sonst gleichen Versuchsbedingungen wurde jeder Ratte ein Milliliter physiologische Kochsalzlösung injiziert.

Auf diese Weise konnte der basale TSH-Spiegel im Serum ermittelt werden.

3.4 Radioimmunologische Bestimmung des Thyreoidea stimulierendes Hormon-Spiegel im Serum der Ratten

3.4.1 Allgemeines zum Radioimmunoassay

Während Steroidhormone aus den Körperflüssigkeiten extrahiert werden können und mit analytischen Reagenzien in spezifischen Reaktionen nachgewiesen werden können, sind Proteohormone wegen fehlender spezifischer Gruppen im eiweißhaltigen Milieu wie dem Blutplasma nicht bestimmbar.

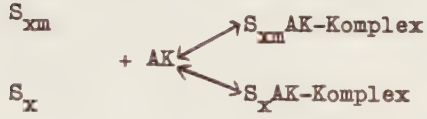
Der erste Weg zur Bestimmung von Proteohormonen war der Bioassay, wobei man die biologische Wirkung von Extrakten auf Versuchstiere bestimmte. Der Bioassay ist jedoch zu unempfindlich für Konzentrationsmessungen im physiologischen Bereich. Neue analytische Möglichkeiten auf dem Gebiet der Proteohormone ergaben sich erst, als man erkannte, daß auch Verbindungen mit relativ niedrigem Molekulargewicht die Bildung spezifischer Antikörper anregen können, d.h. Antigeneigenschaften haben (BERSON und YALOW 1959).

Neue Verfahren, organische Verbindungen mit Isotopen zu markieren, waren dann die Voraussetzung für die Entwicklung der eigentlichen Radioimmunoassays, bei denen die hohe Spezifität immunologischer Methoden mit der hohen Empfindlichkeit radiochemischer Methoden verknüpft ist.

Das radioimmunologische Nachweisverfahren gehört zu den sogenannten Proteinbindungsmethoden. Das wesentliche dabei ist die Wechselwirkung einer Substanz S_x (S_x ist in diesem Fall das TSH), die Antigeneigenschaften hat, mit einem spezifischen Eiweißkörper (dieser Eiweißkörper ist ein gegen S_x gerichteter Antikörper) nach dem Massenwirkungsgesezt:

$$S_x + \text{Antikörper} \Leftrightarrow S_x\text{Antikörperkomplex}$$

Inkubiert man nun radioaktiv markierte Moleküle S_{xm} und unmarkierte Moleküle S_x mit einer definierten Antikörpermenge, so stellt sich folgendes Gleichgewicht ein:



Dabei ist aber Voraussetzung, daß sich radioaktiv markierte Moleküle und unmarkierte Moleküle in bezug auf die Bindungsfähigkeit an den Antikörper nicht unterscheiden.

Je größer nun die zugegebene Menge an unmarkierten Molekülen S_x ist, umso weniger radioaktiv markierte Moleküle S_{xm} können an den Antikörper gebunden werden.

Sind in einem Ansatz die Mengen des Antikörpers und die des radioaktiv markierten Moleküls S_{xm} konstant, dann ist der an den Antikörper gebundene Anteil von S_{xm} umgekehrt proportional der zugegebenen Menge an unmarkiertem Molekül S_x.

Durch Parallelansätze mit definierten Mengen der Substanz S_x ist es möglich, sogenannte Eich- oder Standardkurven zu erstellen. Anhand der Standardkurve läßt sich dann die Menge S_x in der zu untersuchenden Serumprobe feststellen.

3.4.2 Jodierung des Ratten-TSH

3.4.2.1 Vorbereitungen

Bevor das in einer Phiole mit Bleischutz befindliche J^{125} benutzt wird, wird die vom Bleischutz befreite Phiole im Auto-Gamma-Scintillations-Spectrometer bei Einstellung "gain 1o" gemessen. Dabei werden das Zähldatum, die Impulsrate und das Datum, für welches die Radioaktivität des Jods berechnet ist, notiert.

Zusätzlich werden nun auch die Sephadexsäulen hergestellt. Zwei Gramm des Sephadex G 75 werden zu 1oo ml des Puffer 2 gegeben. Danach läßt man das Material drei Stunden lang im kochenden Wasserbad oder 24 Stunden lang im Kühlraum quellen. Nach dem Quellen wird der klare Pufferüberstand abgegossen und durch Puffer 2 ersetzt.

Mit Sephadex G 1oo wird ebenso verfahren.

Die Füllung der Säulen beginnt damit, daß man etwa 1 mm Seesand auf die Glasfritte gibt. Dann wird die Gelaufschwemmung gleichmäßig bis zu einer Höhe von 1o bis 12 cm zugeführt. Danach läßt man 5o ml Puffer 2 durchlaufen.

Weiterhin färbt man 1 ml 4 % BSA-Puffer 2 mit etwas Bromthymolblau an, gibt diese Lösung auf die Säule und eluiert dann so lange mit Puffer 2, bis das Eluat klar ist.

Die große Säule wird mit Sephadex G 1oo bis zu einer Höhe von 43 cm auf dieselbe Weise gepackt und ebenso vorbereitet. Zusätzlich werden nun noch 36 Wassermannröhrchen mit je 5o ul 2 % BSA-Puffer 2 gefüllt und kurz geschüttelt, so daß die Röhrchenwände am Grund benetzt sind.

3.4.2.2 Jodierungsschema

Reihenfolge des Pipettierens:

a) NIAMD-Rat-TSH-I-1 (2,5 ug = 5,o ul)	5 ul +
b) Puffer 1	2o ul
mischen,	+
c) J^{125} (o,5mCi)	5 ul
mischen	+
d) Chloramin T (25o mg ad 1oo ml Puffer 3)	1o ul
mischen, 2o sec warten,	+
e) Natriummetabisulfit (3oo mg ad 1oo ml Puffer 3)	2o ul +
f) 2 % BSA-Puffer 2	2o ul

g) Röhrchen wie die Jodphiole bei Einstellung "gain 1o" zählen.
h) Inhalt des Jodierungsröhrchens mit einer vorher mit 2 % BSA-Puffer 2 benetzten Pasteurpipette auf die Sephadex G 75 Säule übertragen.
i) Pipette mit der Spitze in das Jodierungsröhrchen stecken und wieder bei Einstellung "gain 1o" messen. Zählrate g) minus Zählrate i) = Transfer.
j) Säule mit Puffer 2 eluieren und in o,5 ml Fraktionen in den vorgesehenen Wassermannröhrchen auffangen.
k) Wassermannröhrchen bei Einstellung "gain 1o" zählen.

Aus der Verteilung der Radioaktivität in diesen Fraktionen ergibt sich die Elutionskurve. Der Peak I der Elutionskurve (bei den Röhrchen 6 bis 8) bedeutet das radioaktiv markierte Hormon, während Peak II (bei den Röhrchen 12 bis 14) - auch Salzpeak genannt - Bruchstücke des Hormons, Verunreinigungen und freies radioaktives Jod darstellt.

3.4.2.3 Nachreinigungen

Die Nachreinigungen erfolgen auf den mit Sephadex G 1oo gepackten Säulen. Elutionsmittel ist Puffer 2. Gesammelt werden Fraktionen von 3o Tropfen bei einer Tropfgeschwindigkeit von 2 Tropfen/Minute.

Aus der ersten Reinigung werden zur ersten Nachreinigung die Röhrchen Peak I, Peak I + 1 und Peak I + 2 benutzt. Zur Verminderung der Adsorpiton an den Glaswänden der Auffangröhrchen wird eine Spatelspitze BSA-Pulver vorgegeben. Der Inhalt der Röhrchen Peak I, Peak I + 1 und Peak I + 2 der ersten Nachreinigung wird einer zweiten Nachreinigung unterzogen.

Aus der zweiten Nachreinigung wird der Inhalt der Röhrchen Peak I, Peak I + 1 und Peak I + 2 gemischt und zur Endkonzentration des Tracers mit o,25 % BSA-Puffer 2 verdünnt.

3.4.2.4 Messung der Radioaktivität

Die Messung der Radioaktivität erfolgte im Auto-Gamma-Scintillations-Spectrometer in der Weise, daß die von einer radioaktiven Substanz ausgestrahlten Impulse über einen Zeitraum von 3 Minuten hinweg registriert und als Zählrate (counts) gezählt wurden. Die Summe der ständig registrierten Strahlung wurde als Hintergrundstrahlung (Background) von jedem Meßergebnis der Proben abgezogen.

3.4.2.5 Jodierungsberechnungen

Um das Ergebnis einer Jodierung bezüglich der Menge der gebundenen Radioaktivität pro Hormonmenge zahlenmäßig erfassen zu können, stellt man Jodierungsberechnungen an. Dies ist vor allem auch deshalb wichtig, da die Qualität des jodierten Hormons durch die spezifische Aktivität gekennzeichnet werden kann.

1) Summe der Proteincounts (a bis b) minus (b bis a) mal Background ist gleich Protein	$\sum_{a--b}$ prot - (b--a).bg = prot
2) Summe der Salzcounts (c bis d) minus (d bis c) mal Background ist gleich Salz	$\sum_{c--d}$ salz - (d--c).bg = salz
3) Startmaterialcounts minus Background, auf Volumen von 84,6 % korrigiert, ist gleich korrigiertes Startmaterial	$(SM - bg) \cdot o{,}846 = SM_{korr}$
4) Gefäß- und Pipettencounts minus Background, auf Volumen von 84,6 % korrigiert, ist gleich korrigiertes Gefäß und Pipettenmaterial	$(G/P - bg)\ o{,}846 = G/P_{korr}$
5) Korrigiertes Startmaterial minus Salz ist gleich Gesamtprotein	SM_{korr} - salz = Gesamtprot
I. Ausbeute in % (yield)	$yield = 1oo - \frac{1oo \cdot salz}{SM_{korr}}$
II. Spezifische Aktivität ist gleich yield mal eingesetzte Aktivität (uCi) geteilt durch 1oo mal eingesetzte Menge Hormon (ug)	$spez.Akt. = \frac{yield \cdot eing.Akt.}{1oo \cdot eing.\ Hormon}$
III. Wiederfindung Hormon in %	$RecHormon = \frac{(G/P_{korr} + prot) \cdot 1oo}{Gesamtprot.}$
IV. Wiederfindung Radioaktivität in %	$RecRadioakt. = \frac{(prot+salz) \cdot 1oo}{SM_{korr} - G/P_{korr}}$

Die Ausbeute erreichte im Mittel einen Wert von 67 %. Die spezifische Aktivität wurde im Mittel mit 1oouCi/ug Ratten-TSH berechnet.

Die Wiederfindung des Hormons erreichte im Mittel einen Wert von 91 %.

Die Wiederfindung der Radioaktivität erreichte im Mittel einen Wert von 84 %.

3.4.3 Durchführung des Radioimmunoassay

3.4.3.1 Pipettierschema

Die Durchführung des Radioimmunoassay erfolgte nach folgendem Pipettierschema:

	2%BSA Puffer2	EDTA o,1M in Puffer2	Spez. AK	Tracer	Unspez. AK	Verm. Ser.
T	8oo ul	---	---	5o ul	---	---
B_o	7oo ul	5o ul	5o ul	5o ul	5o ul	5o ul
O	8oo ul	5o ul	---	5o ul	5o ul	5o ul
St 1oo ul Standard-hormon	6oo ul	5o ul	5o ul	5o ul	5o ul	5o ul
S 2oo ul Serum	6oo ul	5o ul	5o ul	5o ul	5o ul	5o ul

Der spezifische Antikörper (NIAMD-Anti-Rat-TSH-Serum-2) wurde mit Puffer 2 im Verhältnis 1: 2o ooo verdünnt.

Der unspezifische Antikörper (Anti-Rabbit-Precipitating Serum donkey for RIA) wurde mit Puffer 2 im Verhältnis 1 : 4,5 verdünnt.

Das Vermehrungsserum (Kaninchenserum, nicht gereinigt) wurde mit Puffer 2 im Verhältnis 1 : 5o verdünnt.

3.4.3.2 Ansatz der Serumproben

In durchnumerierte Reagenzgläser wurden entsprechend dem Pipettierschema Serum der Ratten, EDTA, spezifischer Antikörper und Tracer zugegeben. Die so gefüllten Reagenzgläser wurden gut durchgemischt, mit luftundurchlässiger Folie verschlossen und im Kühlraum bei 4°C gelagert.

Nach einer Inkubationszeit von 4,5 Tagen wurden noch der unspezifische Antikörper und das Vermehrungsserum zugegeben. Nach nochmaligem guten Durchmischen und luftdichtem Verschluß erfolgte eine weitere Inkubation von 36stündiger Dauer bei 4°C.

Von jeder Serumprobe wurden dabei zwei Ansätze gemacht. Nach Beendigung dieser neuerlichen Inkubation wurden die Reagenzgläser in der Kühlzentrifuge bei 10000 Umdrehungen pro Minute 20 Minuten lang zentrifugiert.

Danach wurden die Überstände aus den einzelnen Reagenzgläsern vorsichtig abgegossen, die Röhrchen dann für 20 Sekunden auf den Kopf gestellt und schließlich noch mit einem Watteträger gefegt.

3.4.3.3 Ansatz zur Bestimmung der Totalradioaktivität

In numerierte Reagenzgläser wurde entsprechend dem Pipettierschema nur Puffer und Tracer zugegeben. Diese Ansätze wurden ebenfalls 6 Tage bei 4°C gelagert, aber nicht zentrifugiert und abgegossen.

Zur Bestimmung der Totalradioaktivität wurde eine Dreifachbestimmung vorgenommen.

3.4.3.4 Ansatz zur Bestimmung der Bindungsfähigkeit des radioaktiv markierten Hormons mit dem spezifischen Antikörper (B_o-Bindung)

Da das radioaktiv markierte Hormon durch den Markierungsprozeß und andere physikalische und chemische Ereignisse denaturiert bzw. immunologisch verändert worden sein kann, ist diese Bestimmung auf die ummunologische Funktionsfähigkeit notwendig.

Als B_o-Bindung bezeichnet man die Bindung des radioaktiv markierten Hormons an den spezifischen Antikörper in der nichtkompetitiven Situation, also ohne die Anwesenheit des unmarkierten Hormons. Zur Bestimmung der B_o-Bindung wurde entsprechend dem Pipettierschema und auf die gleiche Weise wie beim Ansatz der Serumproben vorgegangen.

3.4.3.5 Ansatz zur Bestimmung der unspezifischen Bindung

Diese Ansätze wurden entsprechend dem Pipettierschema und der Bestimmung der Serumproben durchgeführt.

Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

3.4.3.6 Ansatz zur Erstellung der Standardkurve

Zur Erstellung der Standardkurve wurden folgende Standardhormonpunkte verwendet: 1ong, 5ong, 75ng, 25ong, 1ooong, 2ooong und 4ooong.

Die Durchführung erfolgte entsprechend dem Pipettierschema und auf die gleiche Art wie beim Ansatz der Serumproben. Um eine größere Genauigkeit zu erreichen, wurden bei der Aufstellung der Standardkurve Dreifachbestimmungen durchgeführt.

3.4.4 Standardkurve

Wie bereits dargestellt, wurden bekannte Mengen unmarkierten Hormons radioimmunologisch bestimmt. Die Menge dieses unmarkierten Hormons wurde in einer Standardkurve gegen den dazugehörigen Quotienten von gebundenem markiertem Hormon (B) zur Maximalmenge an gebundenem Hormon in der nichtkompetitiven Situation (B_o) aufgetragen. Die unbekannten Hormonmengen in den zu untersuchenden Proben konnten nun anhand der bekannten Quotienten B/B_o abgelesen werden.

Nachfolgend sind zwei verschiedene Darstellungen der Standardkurve aufgezeichnet. Daneben sind in der Literatur noch weitere Darstellungen gebräuchlich.

Die Punkte auf den Standardkurven stellen die Mittelwerte der einzelnen Bestimmungen dar, während die senkrechten Linien die Standardabweichungen wiedergeben.

Die Standardkurve in Abbildung 1 hat den Nachteil, daß sie nicht linear verläuft, wodurch die Ablesung der Meßwerte erschwert wird. Nimmt man dagegen eine logarithmische Umformung der x-Achse und eine logit-Transformation der y-Achse vor, so erreicht man eine weitgehende Linearisation der Standardkurve. Diese Umformung, die von RODBARD et al. 1968 empirisch gefunden wurde, wird folgendermaßen berechnet:

$$\text{logit } y = (a - b) \log x$$

$$\text{logit } y = \ln \frac{y}{1-y}$$

$$y = \frac{B}{B_o}$$

$$\log x^o = \frac{a - \text{logit } y}{b}$$

$$\ln x = \ln 1o \times \lg x$$

$$x = e^{\ln x}$$

Abbildung 2 zeigt eine solche nach der log/logit-Transformation aufgezeichnete Standardkurve.

3.4.4.1 Empfindlichkeit der Standardkurve

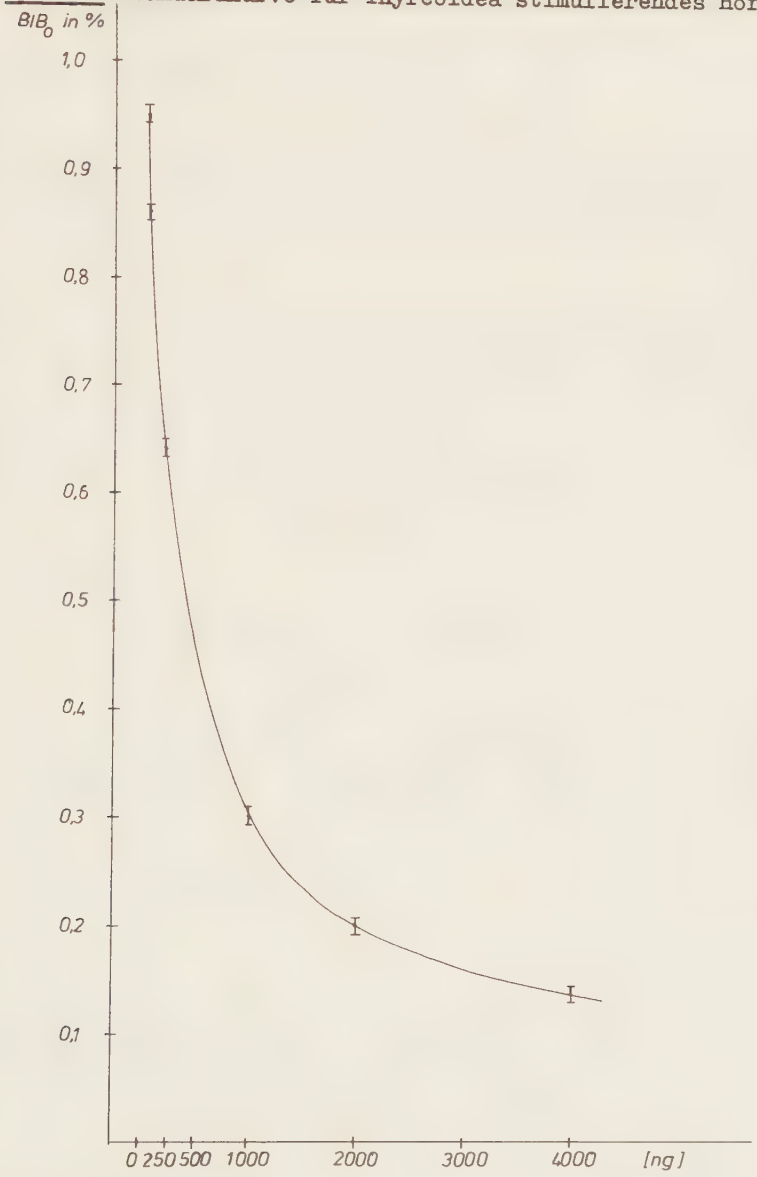
Als Empfindlichkeit der Standardkurve bezeichnet man den Punkt, der mit über 99 % Sicherheit ungleich Null ist. Hierzu werden von dem Mittelwert aller Ergebnisse bei Ong drei Standardabweichungen abgezogen. Der so erhaltene Wert wird auf der Standardkurve aufgetragen und in ng abgelesen.

	counts/3min	B_o/T	B/B	TSH in ng
$\bar{x}$	28236	39,7 %	1,o	Ong
s	64o			
$\bar{x}$	26316	36,6 %	o,95	5ong

Dies bedeutet, daß ein gefundener Wert von 5ong TSH mit 99 % Sicherheit ungleich Null ist.

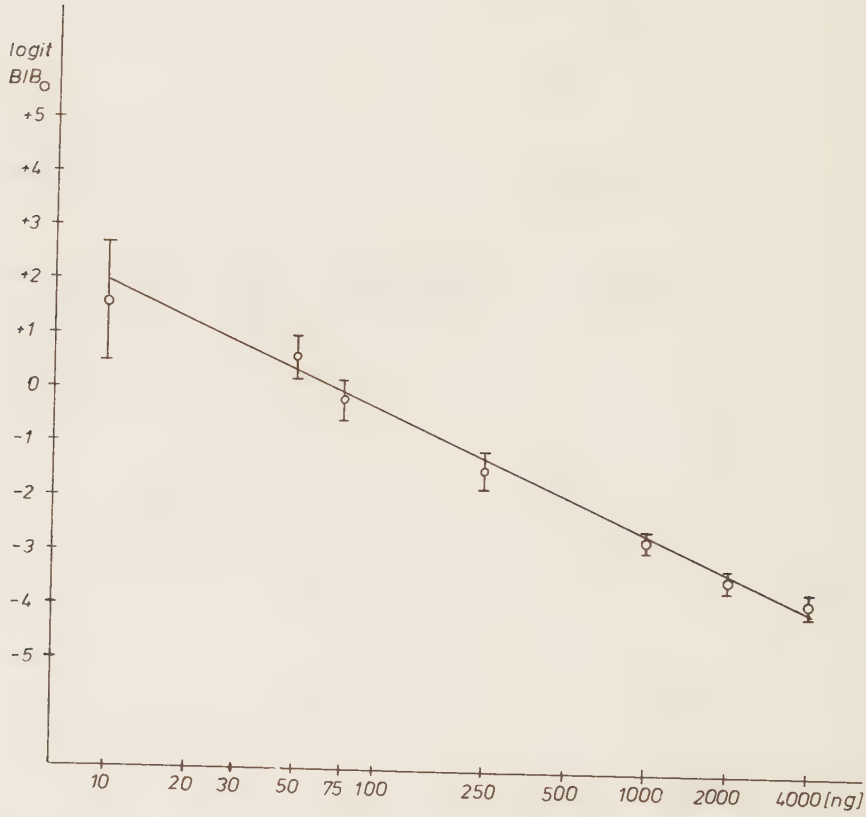
Der Bereich meiner Messungen lag über 15ong.

Abb. 1: Standardkurve für Thyreoidea stimulierendes Hormon



Ordinate: B/B_0 in %
Abszisse: Hormonmenge in ng
Senkrechte Linien: Standardabweichung

Abb. 2: Standardkurve für Thyreoidea stimulierendes Hormon



Ordinate: logit B/B_o
Abszisse: logarithmische Auftragung der Hormonmenge in ng
Senkrechte Linien: Standardabweichung

4 ERGEBNISSE

4.1 Berechnung der Ergebnisse

Die Zählung der Radioaktivität der einzelnen Proben erfolgte im Auto-Gamma-Scintillationsspectrometer bei Einstellung für J^{125}. Die Zählzeit pro Probe betrug dabei jeweils drei Minuten.

Nach der Berechnung der Werte für die Totalradioaktivität, den Background, die unspezifische Bindung, den Standardleerwert, die Standardhormonproben und a, b, r und r^2 erfolgte die Berechnung der Serumproben.

Von jeder Serumprobe wurden folgende Werte bestimmt:

a) B/B_o
b) logit y
c) Hormon im Ansatz in ng
d) Hormon in ng / Serum in ml

Zusätzlich wurden noch von jeder Gruppe (gleiches Molekül, gleiche Dosierung, gleiche Einwirkungszeit) die Standardabweichung s und die Varianz s^2 bestimmt.

4.2 Darstellung der Ergebnisse

a = 6,3o
b = -2,31
r = o,98
r^2 = o,96
Mittelwert Background = 27o,5o Impulse/3 min
Mittelwert Totalradioaktivität minus Mittelwert Background = 71126,83 Impulse/ 3 min
Mittelwert Standardleerwert minus Mittelwert Background = 28235,83 Impulse/ 3 min
Die Ergebnisse der radioimmunologischen Bestimmung der Serumproben sind auf den nachfolgenden Abbildungen 3 bis 14 aufgezeichnet.

4.3 L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-prolinamid

TSH-Gehalt im Serum von Ratten nach intraperitonealer Injektion verschieden hoher Dosen von L-L-L-TRH.

Die Abbildung 3 zeigt den TSH-Gehalt im Serum der Ratten nach Injektion von 1oooong L-L-L-TRH, aufgetragen gegen die Einwirkzeit. Die Kurve steigt vom Basalwert aus steil an zur Einwirkzeit von 1o min, erreicht bei einer Einwirkzeit von 2o min ihr Maximum, fällt bis zur Einwirkzeit von 3o min steil ab und fällt dann etwas flacher bis zur Einwirkzeit von 6o min ab.

Die Abbildung 4 zeigt den TSH-Gehalt im Serum der Ratten nach Injektion von 2ooong L-L-L-TRH. Die Kurve steigt vom Basalwert aus über die Einwirkzeit von 1o min bis zur Einwirkzeit von 2o min steil an, erreicht dort auch ihr Maximum, fällt dann bis zur Einwirkzeit von 3o min wieder steil ab und verläuft dann in einem etwas flacherem Abstieg bis zur Einwirkzeit von 6o min.

Die Abbildung 5 zeigt den TSH-Gehalt im Serum der Ratten nach Injektion von 1ooong L-L-L-TRH. Die Kurve steigt vom Basalwert aus bis zur Einwirkzeit von 1o min steil an, erreicht in einem flachen Verlauf bei einer Einwirkzeit von 2o min ihr Maximum und fällt dann über die Einwirkzeit von 3o min wieder bis zum Basalwert bei einer Einwirkzeit von 6o min ab.

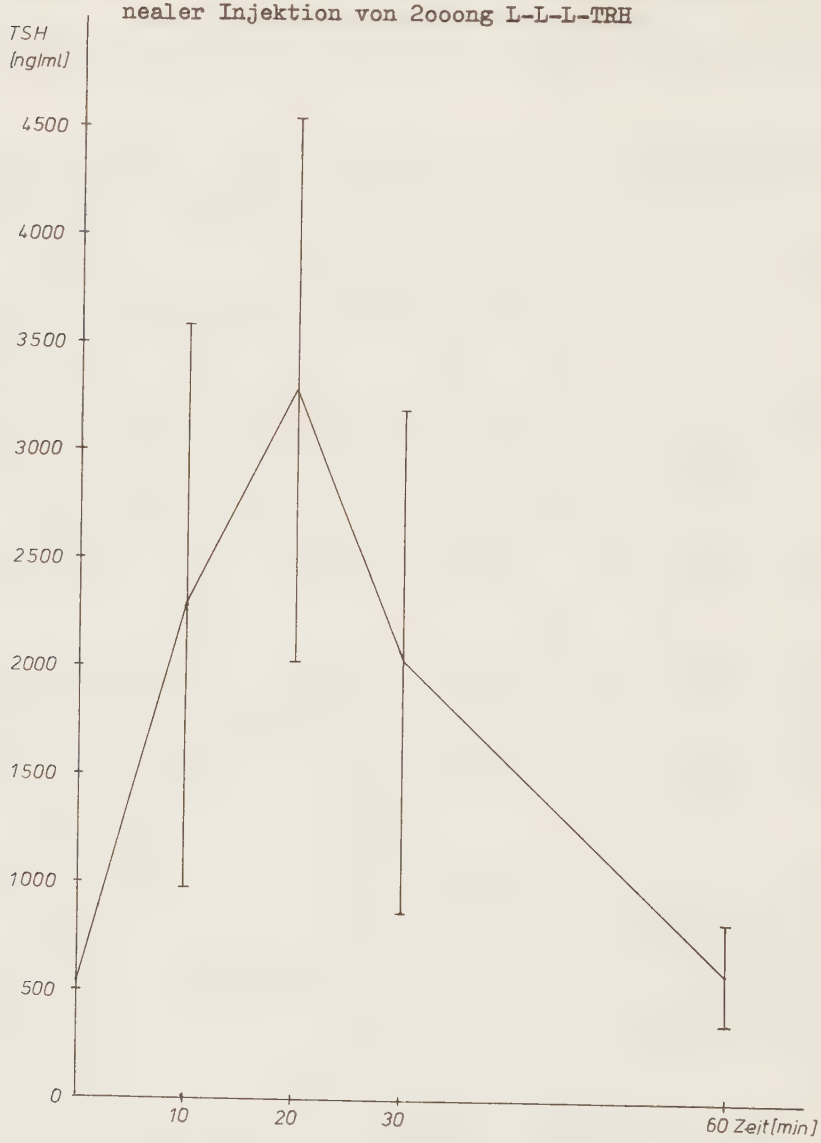
Die Abbildung 6 zeigt den TSH-Gehalt im Serum der Ratten nach Injektion von 1oong L-L-L-TRH. Die Kurve zeigt vom Basalwert aus einen leichten Anstieg bis zur Einwirkzeit von 1o min und fällt dann kontinuierlich bis zur Einwirkzeit von 6o min ab. Insgesamt jedoch kommt die Kurve nicht aus dem Basalwertbereich heraus.

Die Kurven der Abbildungen 3 bis 5 erreichen alle bei einer Einwirkzeit von 2o min ihr Maximum und verlaufen sehr ähnlich, sieht man einmal vom etwas erniedrigten Maximum der Abbildung 5 ab. Die Kurve der Abbildung 6 zeigt ihr Maximum bei einer Einwirkzeit von 1o min, ohne jedoch in ihrer Gesamtheit aus dem Basalwertbereich herauszutreten.

Abb. 3: TSH-Spiegel im Serum von Ratten nach intraperitonealer Injektion von 1oooong L-L-L-TRH

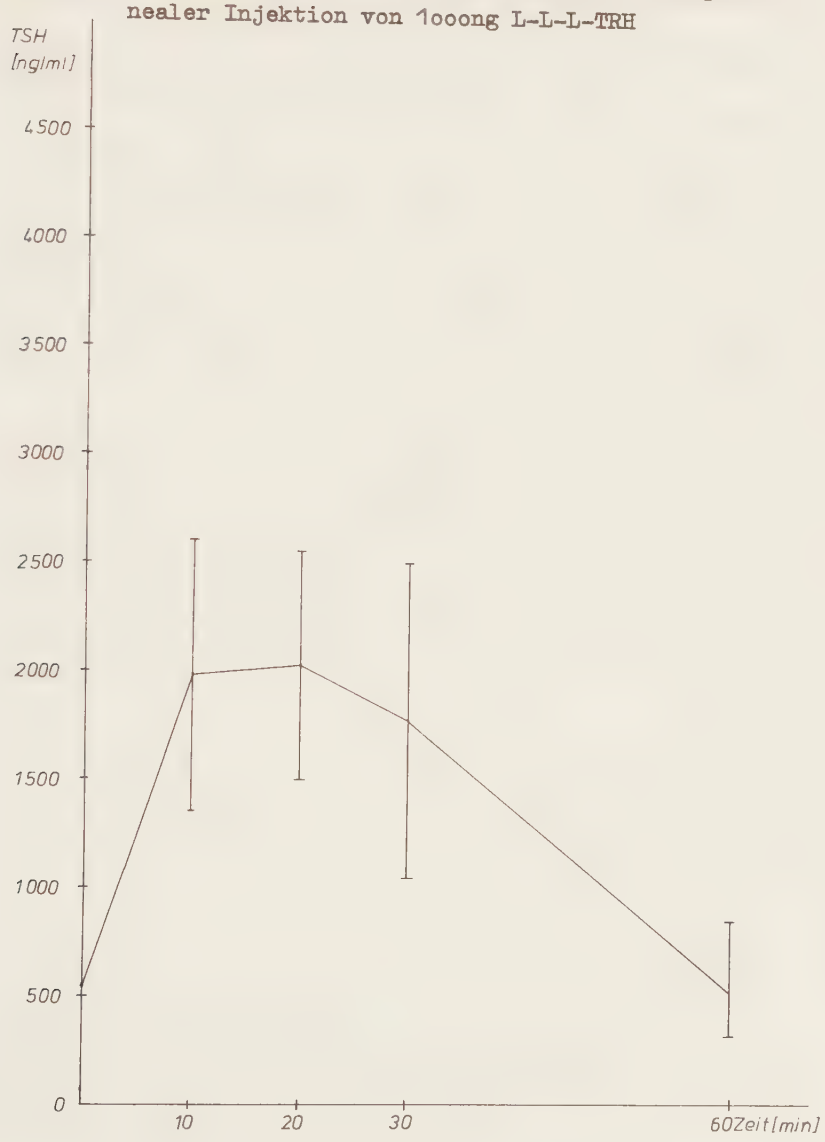
Ordinate: TSH-Gehalt im Serum in ng/ml
Abszisse: Tötungszeit nach Injektion
Senkrechte Linien: Standardabweichung

Abb. 4: TSH-Spiegel im Serum von Ratten nach intraperitonealer Injektion von 2ooong L-L-L-TRH



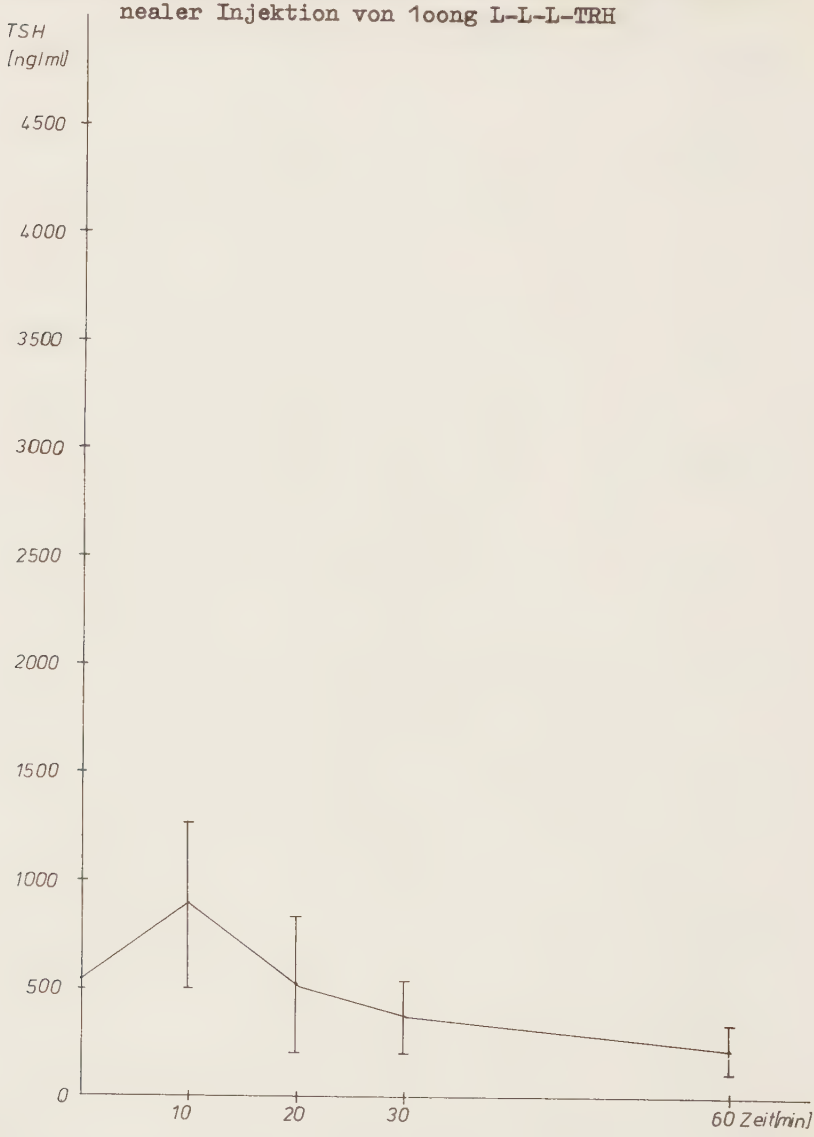
Ordinate: TSH-Gehalt im Serum in ng/ml
Abszisse: Tötungszeit nach Injektion
Senkrechte Linien: Standardabweichung

Abb. 5: TSH-Spiegel im Serum von Ratten nach intraperitonealer Injektion von 1ooong L-L-L-TRH



Ordinate: TSH-Gehalt im Serum in ng/ml
Abszisse: Tötungszeit nach Injektion
Senkrechte Linien: Standardabweichung

Abb. 6: TSH-Spiegel im Serum von Ratten nach intraperitonealer Injektion von 1oong L-L-L-TRH



Ordinate: TSH-Gehalt im Serum in ng/ml
Abszisse: Tötungszeit nach Injektion
Senkrechte Linien: Standardabweichung

4.4 L-pyroglutamyl-D-histidyl-L-prolinamid

TSH-Gehalt im Serum von Ratten nach intraperitonealer Injektion verschieden hoher Dosen von L-D-L-TRH.

Die Abbildung 7 zeigt den TSH-Gehalt im Serum der Ratten nach Injektion von 1oooong L-D-L-TRH. Die Kurve steigt vom Basalwert aus über die Einwirkzeit von 1o min bis zur Einwirkzeit von 2o min steil an und erreicht hier auch ihr Maximum. Die Kurve fällt dann bis zur Einwirkzeit von 3o min steil ab und erreicht dann nach einem etwas flacheren Abstieg bei einer Einwirkzeit von 6o min den Basalwertbereich.

Die Abbildung 8 zeigt den TSH-Gehalt im Serum der Ratten nach Injektion von 2ooong L-D-L-TRH. Die Kurve steigt vom Basalwert aus flach an bis zum Maximum bei der Einwirkzeit von 1o min, fällt dann bis zur Einwirkzeit von 2o min, steigt dann bis zur Einwirkzeit von 3o min wieder flach an und fällt bis zur Einwirkzeit von 6o min in einem sehr flachen Verlauf ab. Diese Kurve verläßt jedoch in ihrer Gesamtheit den Basalwertbereich nicht.

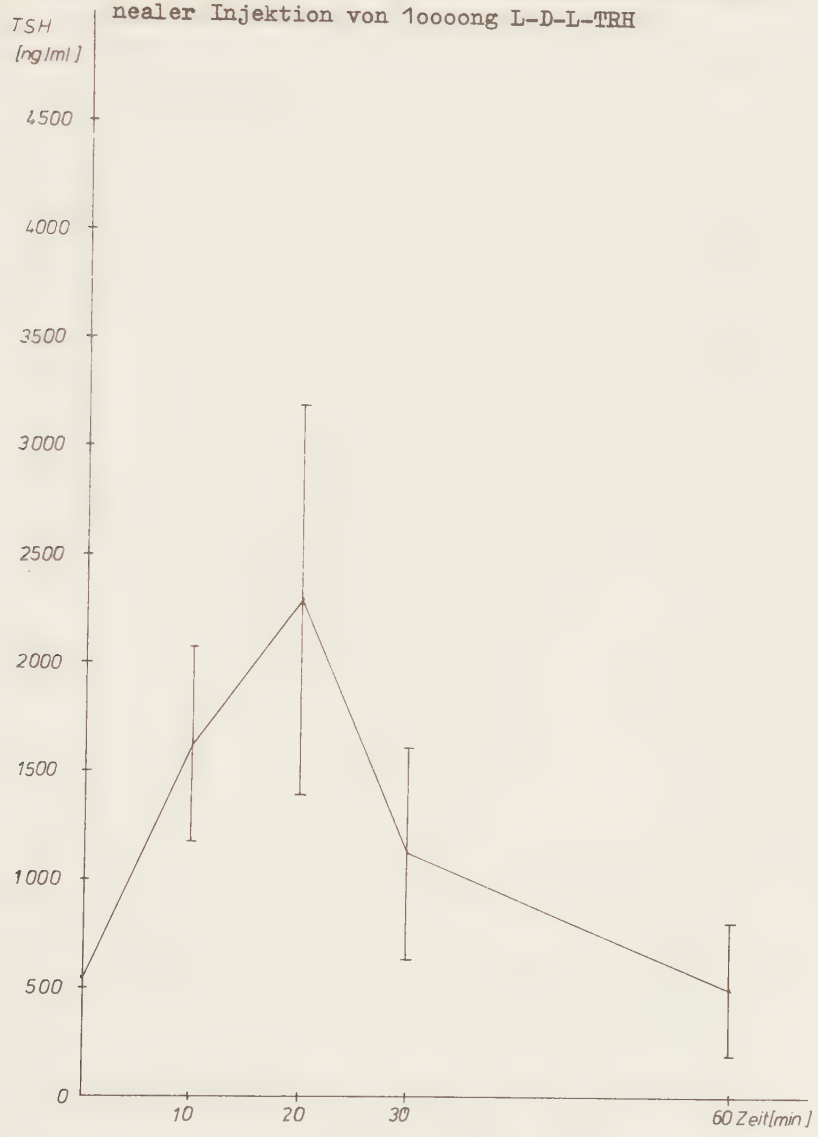
Die Abbildung 9 zeigt den TSH-Gehalt im Serum der Ratten nach Injektion von 1ooong L-D-L-TRH. Die Kurve, die in ihrer Gesamtheit ebenfalls nicht aus dem Basalwertbereich herauskommt, zeigt einen sehr ähnlichen Verlauf wie die Kurve der Abbildung 8.

Die Abbildung 1o zeigt den TSH-Gehalt im Serum der Ratten nach Injektion von 1oong L-D-L-TRH. Die Kurve steigt vom Basalwert aus über die Einwirkzeit von 1o min zur Einwirkzeit von 2o min flach an und erreicht dort auch ihr Maximum. Die Kurve fällt dann über die Einwirkzeit von 3o min zur Einwirkzeit von 6o min hin flach ab.

Lediglich die Kurve der Abbildung 7, bei der 1oooong L-D-L-TRH injiziert wurden, zeigt einen deutlichen Anstieg über

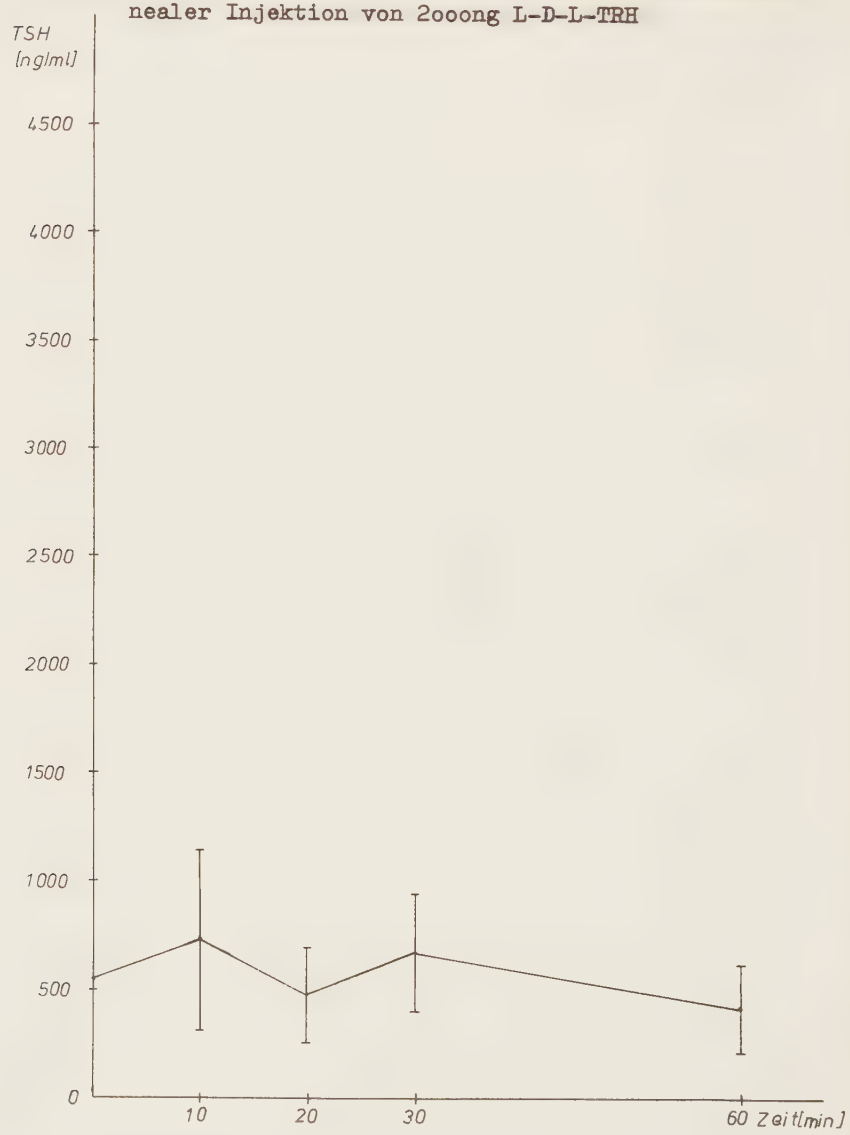
den Basalwertbereich hinaus. Die Kurven der Abbildungen 8 bis 1o jedoch liegen im Bereich der Basalwerte.

Abb. 7: TSH-Spiegel im Serum von Ratten nach intraperitonealer Injektion von 1oooong L-D-L-TRH



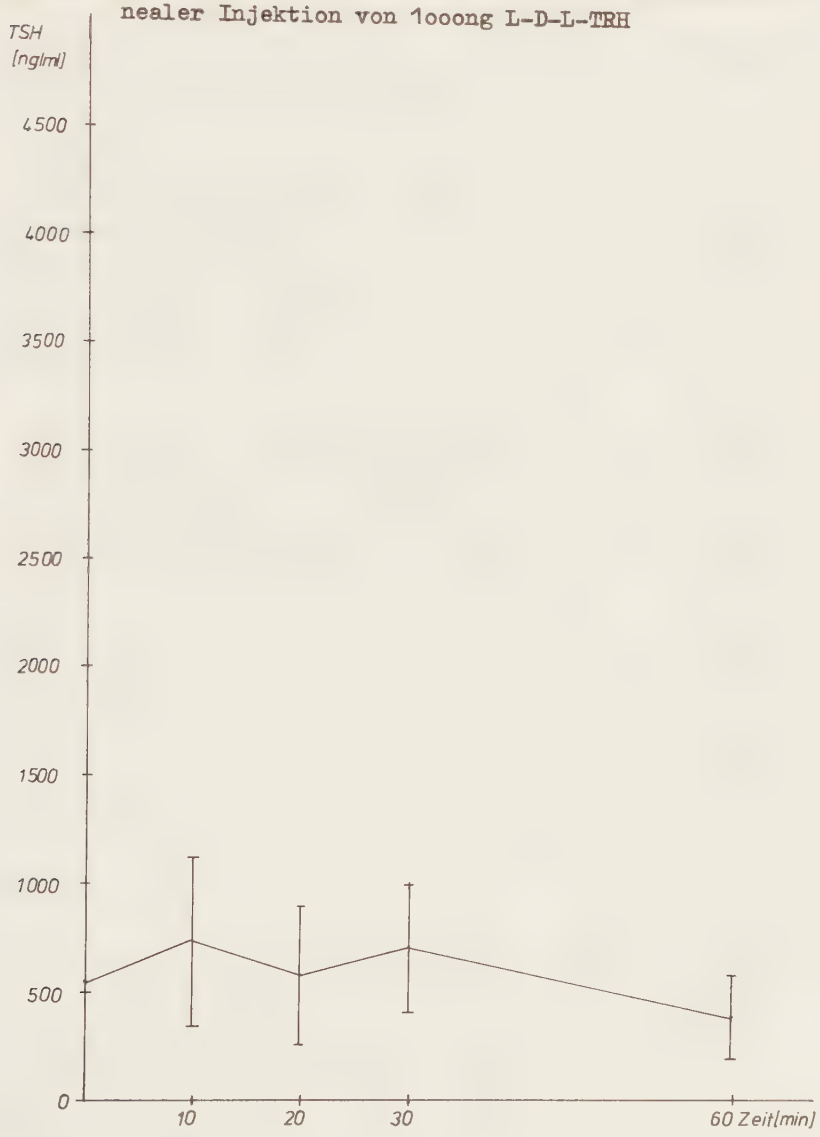
Ordinate: TSH-Gehalt im Serum in ng/ml
Abszisse: Tötungszeit nach Injektion
Senkrechte Linien: Standardabweichung

Abb. 8: TSH-Spiegel im Serum von Ratten nach intraperitonealer Injektion von 2ooong L-D-L-TRH



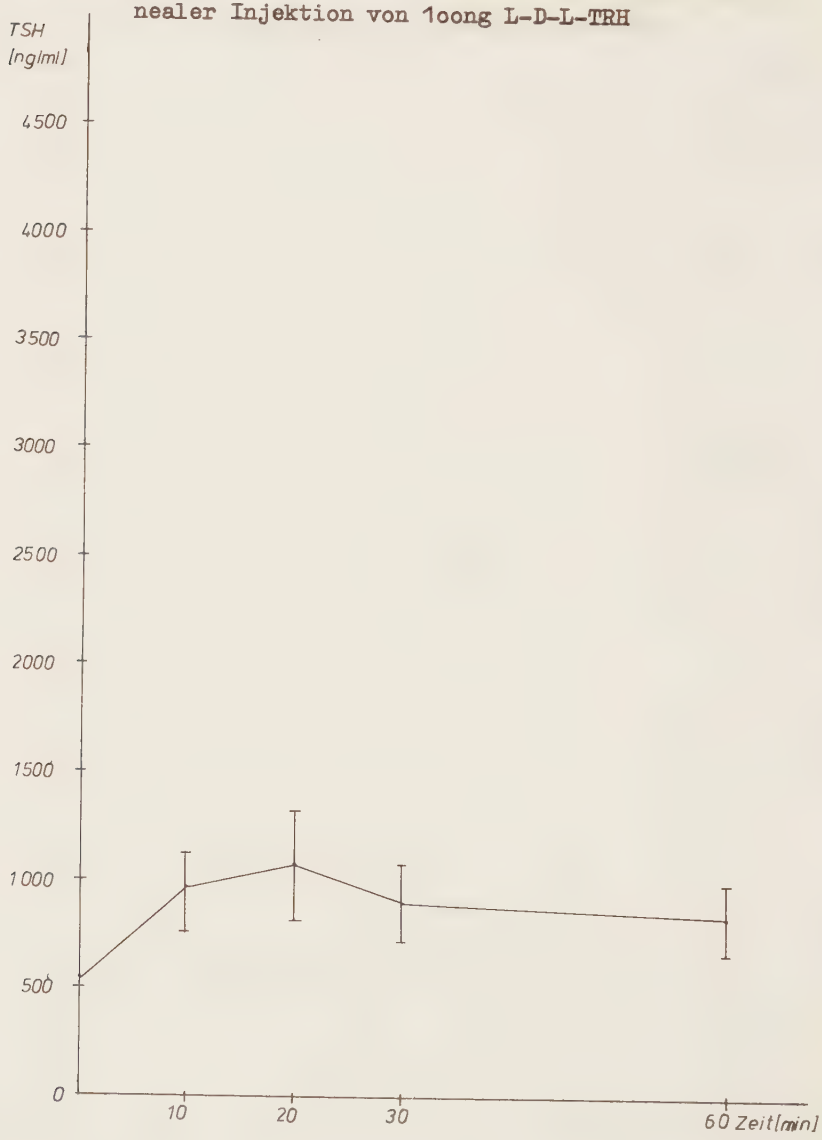
Ordinate: TSH-Gehalt im Serum in ng/ml
Abszisse: Tötungszeit nach Injektion
Senkrechte Linien: Standardabweichung

Abb. 9: TSH-Spiegel im Serum von Ratten nach intraperitonealer Injektion von 1ooong L-D-L-TRH



Ordinate: TSH-Gehalt im Serum in ng/ml
Abszisse: Tötungszeit nach Injektion
Senkrechte Linien: Standardabweichung

Abb. 1o: TSH-Spiegel im Serum von Ratten nach intraperitonealer Injektion von 1oong L-D-L-TRH



Ordinate: TSH-Gehalt im Serum in ng/ml
Abszisse: Tötungszeit nach Injektion
Senkrechte Linien: Standardabweichung

4.5 L-pyroglutamyl-L-phenylalanin-L-prolinamid

TSH-Gehalt im Serum von Ratten nach intraperitonealer Injektion verschieden hoher Dosen von L-LPhe-L-TRH.

Die Abbildung 11 zeigt den TSH-Gehalt im Serum der Ratten nach Injektion von 1oooong L-LPhe-L-TRH. Die Kurve steigt vom Basalwert aus steil bis zur Einwirkzeit von 1o min an, wo sie auch ihr Maximum erreicht. Sie fällt dann über die Einwirkzeiten von 2o und 3o min steil ab und kehrt dann in einem flacheren Verlauf bis zur Einwirkzeit von 6o min wieder in den Basalwertbereich zurück.

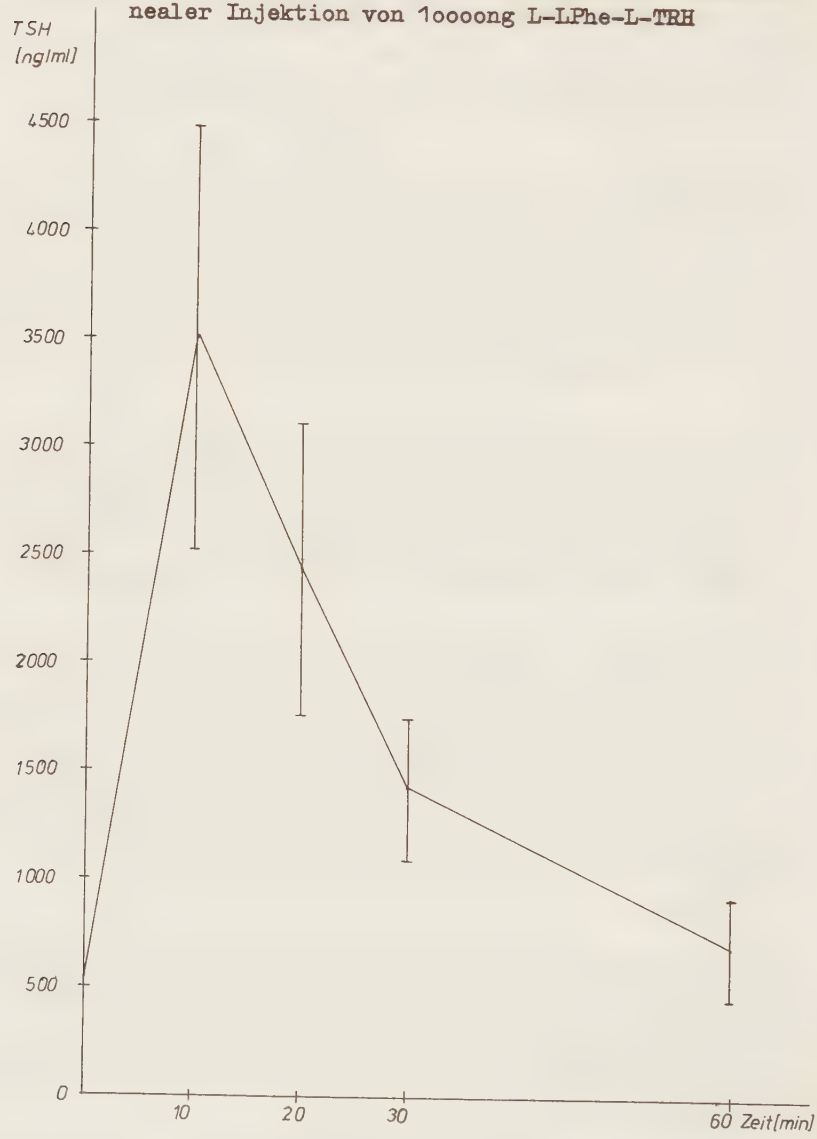
Die Abbildung 12 zeigt den TSH-Gehalt im Serum der Ratten nach Injektion von 2ooong L-LPhe-L-TRH. Die Kurve steigt vom Basalwert aus bis zum Maximum bei der Einwirkzeit von 1o min an, fällt dann ab bis zur Einwirkzeit von 3o min, um dann bis zur Einwirkzeit von 6o min flach abzufallen.

Die Abbildung 13 zeigt den TSH-Gehalt im Serum der Ratten nach Injektion von 1ooong L-LPhe-L-TRH. Die Kurve steigt bis zur Einwirkzeit von 1o min an, erreicht dort ihr Maximum, fällt bis zur Einwirkzeit von 2o min ab, steigt bis zur Einwirkzeit von 3o min wieder etwas an, um dann bis zur Einwirkzeit von 6o min wieder flach abzufallen. Diese Kurve verläßt in ihrer Gesamtheit den Basalwertbereich nicht.

Die Abbildung 14 zeigt den TSH-Gehalt im Serum der Ratten nach Injektion von 1oong L-LPhe-L-TRH. Die Kurve verläuft in einem flachen Anstieg bis zu ihrem Maximum bei einer Einwirkzeit von 1o min und fällt dann bis zur Einwirkzeit von 6o min flach ab.

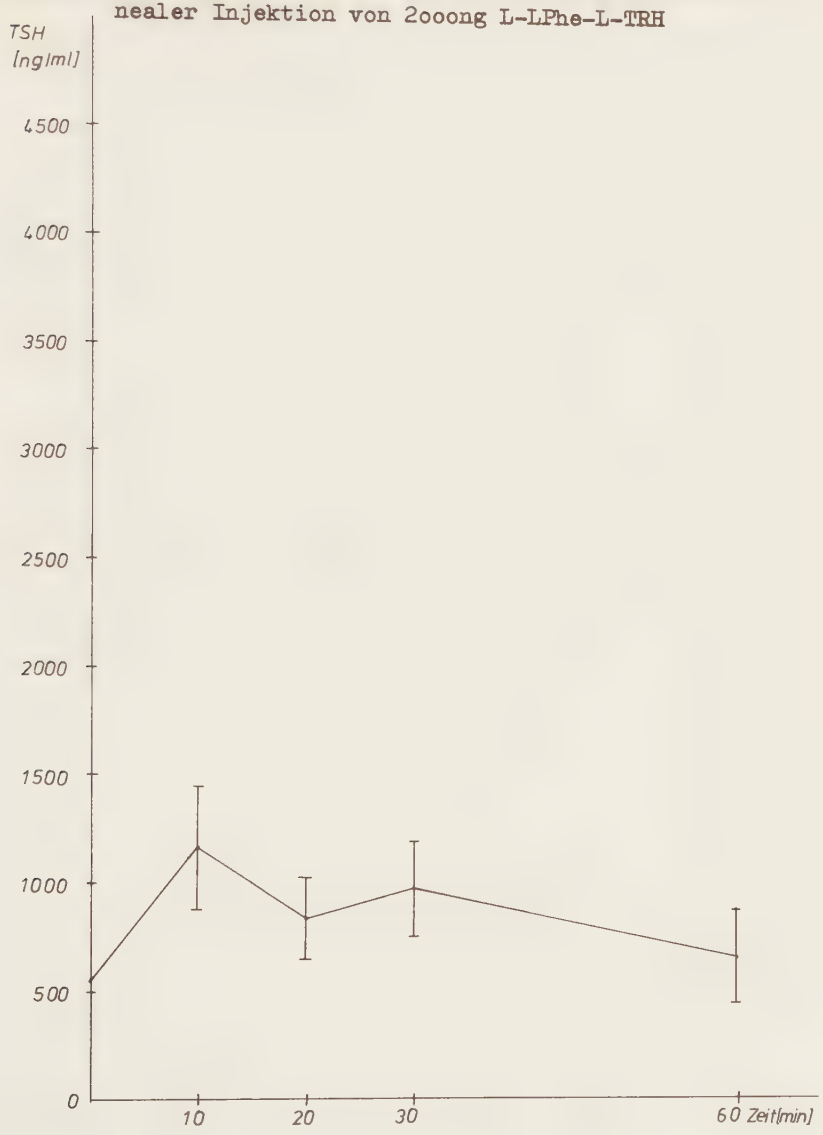
Die Kurve der Abbildung 11 verläuft deutlich oberhalb des Basalwertbereiches. Die Kurve der Abbildung 12 verläuft knapp oberhalb des Basalwertbereiches, während die Kurven der Abbildungen 13 und 14 innerhalb des Basalwertbereiches verlaufen.

Abb. 11: TSH-Spiegel im Serum von Ratten nach intraperitonealer Injektion von 1oooong L-LPhe-L-TRH



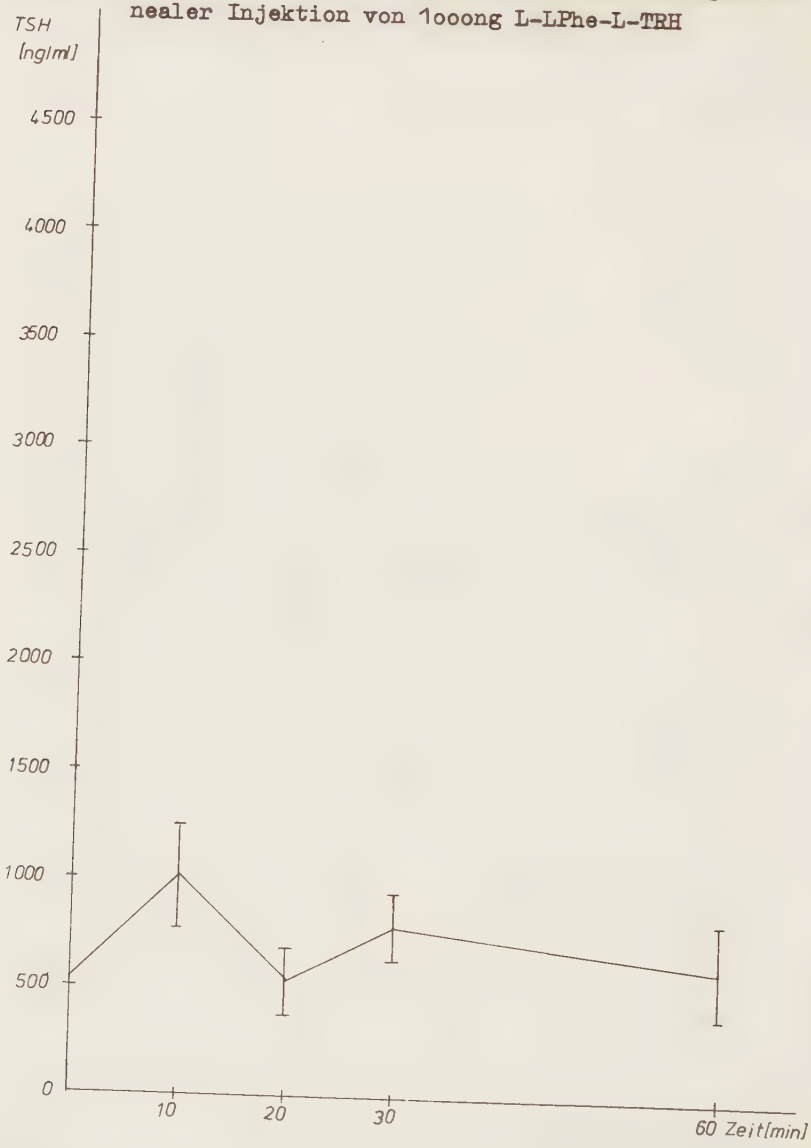
Ordinate: TSH-Gehalt im Serum in ng/ml
Abszisse: Tötungszeit nach Injektion
Senkrechte Linien: Standardabweichung

Abb. 12: TSH-Spiegel im Serum von Ratten nach intraperitonealer Injektion von 2ooong L-LPhe-L-TRH



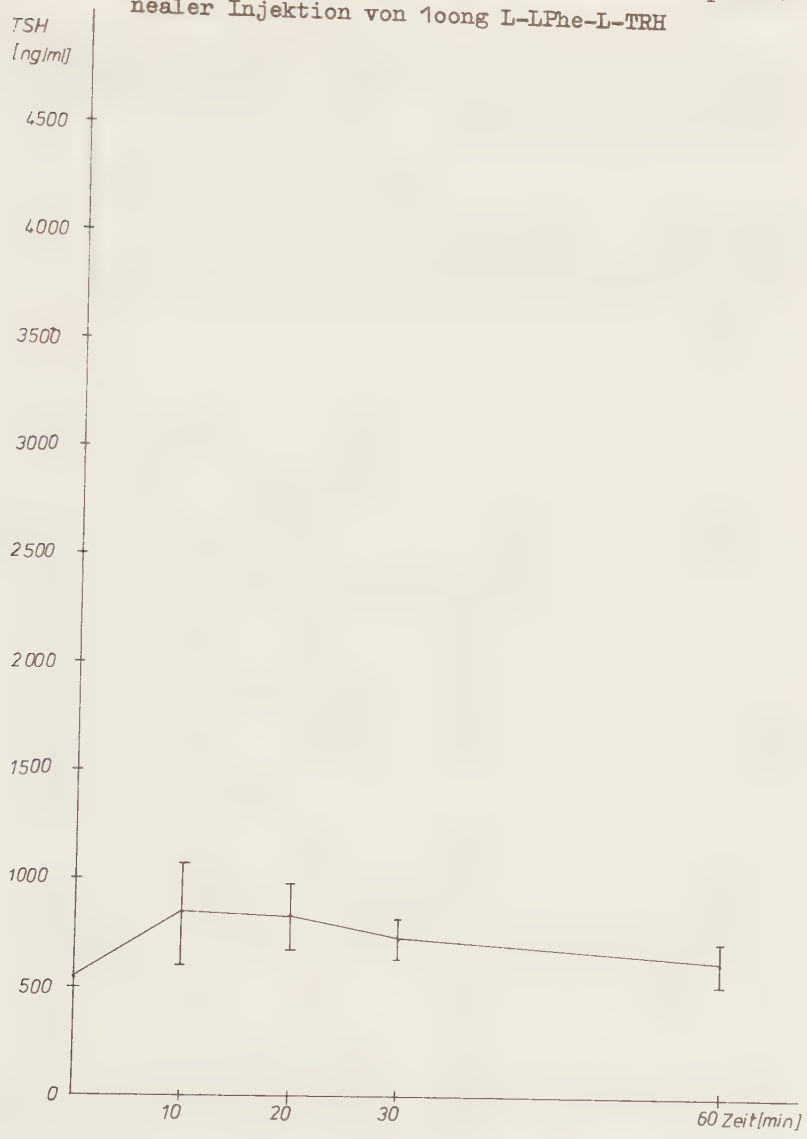
Ordinate: TSH-Gehalt im Serum in ng/ml
Abszisse: Tötungszeit nach Injektion
Senkrechte Linien: Standardabweichung

Abb. 13: TSH-Spiegel im Serum von Ratten nach intraperitonealer Injektion von 1ooong L-LPhe-L-TRH



Ordinate: TSH-Gehalt im Serum in ng/ml
Abszisse: Tötungszeit nach Injektion
Senkrechte Linien: Standardabweichung

Abb. 14: TSH-Spiegel im Serum von Ratten nach intraperitonealer Injektion von 1oong L-LPhe-L-TRH



Ordinate: TSH-Gehalt im Serum in ng/ml
Abszisse: Tötungszeit nach Injektion
Senkrechte Linien: Standardabweichung

4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Der Mittelwert des TSH-Spiegels im Serum der Tiere der Kontrollgruppe betrug 544,52 ng/ml bei einer Standardabweichung von 298 ng/ml.

Nachfolgend sind die übrigen Mittelwerte, die nach bestimmten Einwirkzeiten erreicht wurden, dargestellt. Dabei werden die Dosierungen in ng, die Mittelwerte in ng/ml und die in Klammern stehenden Einwirkzeiten in Minuten angegeben.

Dosierung / Art des TRH-Moleküls	10000	2000	1000	100
L-L-L-TRH	2031,7 (10)	2288,6 (10)	1982,7 (10)	907,1 (10)
L-D-L-TRH	1625,1 (10)	733,5 (10)	764,8 (10)	946,3 (10)
L-LPhe-L-TRH	3502,8 (10)	1172,7 (10)	1001,0 (10)	859,5 (10)
L-L-L-TRH	2962,2 (20)	3278,7 (20)	2019,8 (20)	528,0 (20)
L-D-L-TRH	2308,6 (20)	497,0 (20)	582,2 (20)	1078,4 (20)
L-LPhe-L-TRH	2437,8 (20)	837,8 (20)	545,4 (20)	813,7 (20)
L-L-L-TRH	1985,5 (30)	2033,6 (30)	1761,4 (30)	378,3 (30)
L-D-L-TRH	1228,2 (30)	680,0 (30)	712,6 (30)	900,8 (30)
L-LPhe-L-TRH	1428,9 (30)	977,1 (30)	790,3 (30)	726,9 (30)
L-L-L-TRH	959,0 (60)	599,2 (60)	521,9 (60)	213,0 (60)
L-D-L-TRH	510,7 (60)	419,7 (60)	370,8 (60)	836,5 (60)
L-LPhe-L-TRH	699,5 (60)	655,9 (60)	610,9 (60)	628,8 (60)

5 DISKUSSION

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine tierexperimentelle Studie. Nach Injektion verschieden hoher Dosen von synthetischem TRH und zweier TRH-Analoga wurde nach verschiedenen Einwirkzeiten der TSH-Gehalt im Serum von Ratten bestimmt.

Mit Hilfe einer solchen Studie ist es möglich, nachzuweisen, ob es eine dosisabhängige Wirkung des synthetischen TRH gibt und wie groß die biologische Aktivität der beiden TRH-Analoga ist.

5.1 Methode

Zur Bestimmung des TSH-Gehaltes im Serum von Ratten wurde die radioimmunologische Methode angewandt, wie sie vom National Institute of Arthritis and Metabolic Disease, Bethesda, USA, beschrieben wird.

Zum einen hängt die Genauigkeit einer Methode entscheidend von der Aufarbeitung der Plasmaextrakte ab. Da in diesem Fall weder eine Extraktion noch eine Anreicherung des Ratten-TSH notwendig war, kann hier mit einem sehr kleinen Fehler gerechnet werden.

Zum zweiten wurden zur Verringerung der Fehlerquote von jeder möglichen Kombination der Art des injizierten TRH-Moleküls, der Dosierung und der Einwirkzeit je vier Versuchstiere verwendet und von jeder Probe Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die Summe des mittleren Wertes der unspezifischen Bindung und der dreifachen Standardabweichung war mit o,o75 % B/B_o sehr gering.

Die Regression r zeigt mit o,98 ebenfalls einen sehr guten Wert.

Weiterhin lagen auch die durchgeführten Messungen mit zumindest 15ong weit über der berechneten Empfindlichkeit der Standardkurve.

Da neben der Methode der radioimmunologischen Bestimmung des Ratten-TSH auch noch die Referenz-Substanz und der spezifische Antikörper vom National Institute of Arthritis and Metabolic Disease, USA, geliefert wurden, wurden in dieser Hinsicht keine weiteren Versuche angestellt.

5.2 Synthetisches TRH (L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-prolinamid)

Der TSH-Gehalt im Serum der Ratten zeigt nach intraperitonealer Injektion von 1oong L-L-L-TRH bei keiner der untersuchten Einwirkzeiten einen Anstieg über den Basalwertbereich hinaus.

Nach einer intraperitonealen Injektion von 1ooong L-L-L-TRH zeigt sich jedoch ein deutlicher Anstieg des TSH-Gehalts, wobei der höchste TSH-Spiegel nach einer Einwirkzeit von 2omin gemessen wurde.

Bei Injektion von 2ooong L-L-L-TRH stieg der TSH-Spiegel lediglich noch im Bereich des Maximums nach einer Einwirkzeit von 2o min an, zeigte aber sonst keine signifikanten Abweichungen gegenüber der nach Injektion von 1ooong L-L-L-TRH erhaltenen Kurve.

Auch mit einer weiteren Erhöhung der injizierten Dosis auf 1oooong L-L-L-TRH konnte keine Steigerung des TSH-Gehalts im Serum mehr hervorgerufen werden.

Es zeigte sich also, daß der TSH-Spiegel im Serum der Ratten mit einer intraperitoneal verabreichten Dosis von 1oong L-L-L-TRH nicht wesentlich zu beeinflussen ist. Mit Dosen von 1ooong L-L-L-TRH werden aber bereits stark erhöhte TSH-Werte im Serum der Ratten erreicht, die mit noch höheren Dosierungen von 2ooong und 1oooong L-L-L-TRH nicht mehr gesteigert werden können.

Eine dosisabhängige Wirkung von L-L-L-TRH über eine injizierte Menge von 1ooong hinaus ist also nicht vorhanden.

5.3 L-pyroglutamyl-D-histidyl-L-prolinamid und L-pyroglutamyl-L-phenylalanin-L-prolinamid

Die TSH-Spiegel im Serum der Ratten blieben nach Injektion von 1oong L-D-L-TRH und L-LPhe-L-TRH bei allen Einwirkzeiten im Basalwertbereich.

Auch nach Injektion von 1ooong L-D-L-TRH, bzw. L-LPhe-L-TRH ließen sich keine erhöhten TSH-Werte im Serum erkennen. Nach intraperitonealer Injektion von 2ooong L-D-L-TRH ließ sich ebenfalls zu keiner der untersuchten Einwirkzeiten ein erhöhter TSH-Spiegel im Serum feststellen.

Nach Injektion von 2ooong L-LPhe-L-TRH erreichte der TSH-Spiegel nach einer Einwirkzeit von 1o min ein Maximum, das über dem Basalwertbereich lag. Die nach den folgenden Einwirkzeiten gemessenen TSH-Werte lagen jedoch bereits wieder im Basalwertbereich.

Erst bei Injektionen von 1oooong der beiden TRH-Analoga zeigte sich ein signifikanter Anstieg des TSH-Spiegels im Serum der Ratten.

Nach Injektion von 1oooong L-D-L-TRH wurde der maximale TSH-Gehalt nach einer Einwirkzeit von 2o min erreicht. Die Kurve zeigte einen ähnlichen Verlauf wie die nach Injektion von 1ooong L-L-L-TRH gefundene Kurve, die ihr Maximum ebenfalls nach einer Einwirkzeit von 2o min erreichte. Nach Injektion von 1oooong L-LPhe-L-TRH wurde bereits nach einer Einwirkzeit von 1o min der höchste TSH-Gehalt gemessen. Der TSH-Gehalt fiel dann über die Einwirkzeiten von 2o, 3o und 6o min wieder zum Basalwert ab.

Es konnte also festgestellt werden, daß erst Dosen von 1oooong L-D-L-TRH oder L-LPhe-L-TRH zu einem deutlichen

Anstieg der TSH-Werte führten, wie sie bereits von einer Menge von 1ooong L-L-L-TRH erreicht wurden.

Insgesamt kann also sowohl dem L-D-L-TRH als auch dem L-LPhe-L-TRH eine biologische Aktivität in Höhe von 1o %, bezogen auf die Aktivität von L-L-L-TRH, zugesprochen werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Anhand einer tierexperimentellen Untersuchung wurde bei 192 Ratten der TSH-Spiegel im Serum nach intraperitonealer Injektion der Dosen von 1oo, 1ooo, 2ooo und 1oooong L-L-L-TRH, L-D-L-TRH und L-LPhe-L-TRH bei Einwirkzeiten von 1o, 2o, 3o und 6o min untersucht.

Als Versuchstiere wurden weibliche Albinoratten vom Stamm Whistar verwendet.

Als Kontrollgruppe wurden 15 Tiere herangezogen, denen physiologische Kochsalzlösung injiziert wurde.

Das durch Decapitation gewonnene Blut wurde abgesert und sofort tiefgefroren.

Nach Ablauf aller Tierversuche wurde der TSH-Gehalt im Serum radioimmunologisch bestimmt.

Es zeigte sich, daß Dosen von 1oong L-L-L-TRH keinen Anstieg der TSH-Werte im Serum zur Folge hatten, während mit einer Dosis von 1ooong L-L-L-TRH die TSH-Werte stark anstiegen. Mit einer weiteren Erhöhung dieser Dosen auf 2ooo und 1oooong L-L-L-TRH ließ sich jedoch keine Erhöhung der TSH-Werte im Serum erreichen.

Sowohl bei L-D-L-TRH als auch bei L-LPhe-L-TRH konnten nur nach injizierten Dosen von 1oooong deutlich erhöhte TSH-Werte im Serum hervorgerufen werden, während die niedrigeren Dosierungen von 1oo, 1ooo und 2ooong zu keiner Erhöhung der TSH-Werte im Serum der Ratten führten.

7 LITERATUR

BAUGH, C. M., KRUMDIECK, C. L., HERSHMAN, J. M. and J. A. PITTMAN, Jr.: Synthesis and biological activity of thyrotropin-releasing hormone;
Endocrinol. 87 (1970) 1015 - 1021

BERSON, S. A. and R. S. YALOW: Methods in Investigative and Diagnostic Endocrinology;
American Elsevier Publishing Company Inc. New York, Band 2A und 2B, 1973

BØLER, J., ENZMANN, F., FOLKERS, K., BOWERS, C. Y. and A. V. SCHALLY: The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-proline-amid;
Biochem. Biphys. Res. Commun. 37 (1969) 705 - 710

BOWERS, C. Y., REDDING, T. W. and A. V. SCHALLY: Effect of thyrotropin releasing factor (TRF) of ovine, bovine, porcine and human origin on thyrotropin release in vitro and in vivo;
Endocrinology 77 (1965) 609 - 616

BOWERS, C. Y., SCHALLY, A. V., REYNOLDS, G. A. and W. D. HAWLEY: Interactions of L-thyroxine or L-trijodothyronine and thyrotropin-releasing factor on the release and synthesis of thyrotropin from the anterior pituitary gland of mice;
Endocrinology 81 (1967) 741 - 747

BOWERS, C. Y., SCHALLY, A. V., HAWLEY, W. D., GUAL, C. and A. F. PARLOW: Effect of thyrotropin-releasing factor in man;
J. Clin. Endocrinol. Metab. 28 (1968) 978 - 982

BOWERS, C. Y., SCHALLY, A. V., ENZMANN, F., BØLER, J. and K. FOLKERS: Procine thyrotropin releasing hormone is (Pyro) Glu-His-Pro (NH_2);
Endocrinology 86 (1970) 1143 - 1153

BURGUS, R., DUNN, T. F., DESIDERIO, D., VALE, W. und R. GUILLEMIN: Derivés polypeptidiques de synthèse doués d'activité hypophysiotrope TRF;
Nouvelles observations. C. R. Acad. Sci. (Paris) 269 (1969) 226 - 228

BURGUS, R., DUNN, T. F., DESIDERIO, D. M., WARD, D. N., VALE, W., GUILLEMIN, R., FELIX, A. M., GILLESEN, D. and R. O. STUDER: Biological activity of synthetic polypeptide derivates related to the structure of hypothalamic TRF;
Endocrinology 86 (1970) 573 - 582

D'ANGELO, S. A.: Central nervous regulation of the secretion and release of thyroid stimulating hormone;
In Advances in Neuroendocrinology (A. V. NALBANDOV, ed.), pp 158-21o, University of Illinois Press, Urbana, Ill, 1963

ENZMANN, F., BØLER, J., BOWERS, C. Y. and A. V. SCHALLY: Structure and synthesis of the thyrotropin-releasing hormone;
J. Med. Chem. 14 (1971) 469 - 474

FLOURET, G.: Synthesis of pyroglutamyl-histidyl-prolinamide by classical and solid phase methods;
J. Med. Chem. 13 (197o) 843 - 845

FLOURET, G., MORGAN, R., GENDRICH, R., WILBER, J. and M. SEIBEL: Synthesis of the Thyrotropin-Releasing Hormone Enantiomer and Some Diastrereoisomers and in Vitro Studies of Their Biological Activity;
J. Med. Chem. 16 (1973) 1137 - 114o

FOLKERS, K., ENZMANN, F., BØLER, J., BOWERS, C. Y. and A. V. SCHALLY: Discovery of modification of the synthetic tripeptide-sequence of the thyrotropin-releasing hormone having activity;
Biochem. Biphys. Res. Commun. 37 (1969) 123 - 126

GANONG, W. F. and L. LORENZEN: Brain neurohumors and endocrine function;
In Neuroendocrinology (L. MARTINI and W. F. GANONG, eds.), 2, pp 583 - 64o, Academic Press, New York, 1967

GILLESEN, D., FELIX, A. M., LERGIER, W. und R. O. STUDER: Synthese des Thyrotropin-releasing Hormons (TRH) (Schaf) und verwandter Peptide;
Helv. Chim. Acta 53 (197o) 63 - 72

GREEN, J. D. and G. W. HARRIS: Observation of the hypophysioportal vessels of the living rat;
J. Physiol. (London) 1o8 (1949) 359 - 361

GREER, M. A.: Studies on the influence of the central nervous system on anterior pituitary function. In Recent Progress in Hormone Research (G. PINCUS, ed.) 18 (1957), 67-98, Acamdemic Press, New York

GUAL, C., KASTIN, A. J. and A. V. SCHALLY: Clinical Experiene with Hypothalamic Releasing Hormones, Part 1: Thyrotropin-Releasing Hormone;
Rec. Progr. Hormone Res. 28 (1972) 173

GUILLEMIN, R.: Hypothalamic factors releasing pituitary hormones;
In Recent Progress in Hormone Research (G. PINCUS, ed.), 2o (1964) 89 - 121, Academic Press, New York

GUILLEMIN, R.: Hypothalamic polypeptides stimulating the secretion of pituitary hormones;
In Proceedings of the 23rd International Congress of Physiological Sciences (D. NOBLE, ed.) 1965, 284 - 291, Excerpta Medica, Amsterdam

GUILLEMIN, R.: The adenohypophysis and its hypothalamic control;
Ann. Rev. Physiol. 29 (1967) 313 - 348

GUILLEMIN, R., YAMAZAKI, E., JUSTIZ, M. und E. SAKIZ: Precence dans un extrait de tissus hypothalamiques d'une substance stimulant la sécrétion de l'hormone hypophysaire thyreotrope (TSH). Premieère purification par filtration sur gel sephadex;
C. R. Acad. Sci. (Paris) 255 (1962) 1o18 - 1o2o

GUILLEMIN, R., SAKIZ, E. and D. N. WARD: Further purification of TSH-releasing factor (TRF) from sheep hypothalamic tissues, with observations on the amino acid composition;
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 118 (1965) 1132 - 1137

GUILLEMIN, R., BURGUS, R., SAKIZ, E. und D. N. WARD: Nouvelles donées sur la purification de l'hormone hypothalamique TSH-hypophysiotrope, TRF;
C. R. Acad. Sci. (Paris) 262 (1966) 2278 - 228o

GUPTA, D. und W. VOELTER: Herausgeber "European Colloquium on Hypothalamic Hormones;
Z. Naturforsch. 29c (1974) 1oo

HARRIS, G. W.: Neural control of the Pituitary Gland;
Arnold, London

HEINEMANN, G. and K. FEDERLIN: Methods for the Production of Antibodies against Low-Molecular Proteohormones;
Immunological Methods in Endocrinology, G. Thieme 53, 1971

HORSTER, F. A. und W. WILDMEISTER: Klinische Bedeutung des synthetischen TRH;
Dtsch. med. Wschr. 96 (1971) 175

HOUSSAY, B., BIASOTTI, A. und R. SAMMARTINO: Modifications functionelles de l'hypophyse aprés les lesions infundibulotubériennes chez le capaud;

INOUYE, K., NAMBA, K. and H. OTSUKA: A synthesis of thyrotropin-releasing factor;
Bull. Chem. Soc. Jap. 44 (1971) 1689 - 1691

McCANN, S. M. and A. P. S. DHARIWHAL: Hypothalamic releasing factors and the neurovascular link between the brain and the anterior pituitary;
In Neuroendocrinology (L. MARTINI and W. F. GANONG, eds.) 1 (1966) 261 - 296; Acamemic Press, New York

McCANN, S. M. and J. C. PORTER: Hypothalamic pituitary stimulating and inhibiting hormones;
Physiol. Rev. 49 (1969) 24o-248

MITTENECKER, E.: Planung und statistische Auswertung von Experimenten;
Verlag Franz Deuticke, Wien, 1966

MITTLER, J. C., REDDING, T. W. and A. V. SCHALLY: Stimulation of thyrotropin (TSH) secretion by TSH-releasing factor (TRF) in organ cultures of anterior pituitary;
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 13o (1969) 4o6 - 4o9

NAIR, R. M. G., BARRETT, J. F., BOWERS, C. Y. and A. V. SCHALLY: Structure of porcine thyrotropin releasing hormone;
Biochemistry 9 (197o) 11o3 - 11o6

PUTTKAMER, K. v., KLEMM, W., GUPTA, D., ZECH, K.,FUCHS, S. and W. VOELTER: The importance of the second amino acid in tripeptide-thyrotropin releasing hormone molecules for the biological activity;
Jour. of Endocrinology 65 (1975) 16P

REICHLIN, S.: Neuroendocrinology;
N. Engl. J. Med. 269 (1963) 1182 - 1191

RODBARD, D., RAYFORD, P. L., COOPER, J. A. and G. T. ROSS: Statistical quality control of radioimmunoassays;
J. Clin. Endocrin. 28 (1968) 1412

SCHALLY, A. V., BOWERS, C. Y. and T. W. REDDING: Presence of thyrotropic hormone-releasing factor (TRF) in porcine hypothalamus;
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121 (1966a) 718 - 722

SCHALLY, A. V., BOWERS, C. Y. and T. W. REDDING: Purification of thyrotropic hormone-releasing factor from bovine hypothalamus;
Endocrinology 78 (1966b) 726 - 732

SCHALLY, A. V. and T. W. REDDING: In vitro studies with thyrotropin-releasing factor;
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 126 (1967) 32o - 325

SCHALLY, A. V., MÜLLER, E. E., ARIMURA, A., BOWERS, C. Y., SAITO, T., REDDING, T. W., SAWANO, S. and P. PIZZOLATO: Releasing factors in human hypothalamic and neurohypophysial extracts;
J. Clin. Endocrinol. 27 (1967) 755 - 762

SCHALLY, A. V., ARIMURA, A., BOWERS, C. Y., KASTIN, A. J., SAWANO, S. and T. W. REDDING: Hypothalamic neurohormones regulating anterior pituitary function;
In Recent Progress in Hormone Research (E. B. ASTWOOD, ed.) 24 (1968) pp 497 - 581. Academic Press, New York

SCHALLY, A. V., REDDING, T. W., BOWERS, C. Y. and J. F. BARRETT: Isolation and properties of porcine thyrotropin-releasing hormone;
J. Biol. Chem.244 (1969) 4o77 - 4o88

SCHALLY, A. V., NAIR, R. M. G., BARRETT, J. F., BOWERS, C. Y. and K. FOLKERS: The structure of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone;
Fed. Proc. 29 (197oa) 47o

SCHALLY, A. V., ARIMURA, A., BOWERS, C. Y., WAKABAYASHI, I., KASTIN, A. J., REDDING, T. W., MITTLER, J. C., NAIR, R. M. G., PIZZOLATO, P. and A. J. SEGAL: Purification of hypothalamic releasing hormones of human origin;
J. Clin. Endocrin. Metab. 31 (197ob) 291 - 3oo

SCHREIBER, V., RYBAK, M. ECKERTOVA, A., JIRGI, V., KOCI, J., FRANC, Z. and V. KMENTOVA: Isolation of a hypothalamic peptide with TRF (thyrotropin releasing factor) activity in vitro;
Experientia 18 (1962) 388

SKELLEY, D. S., BROWN, L. P. and P. K. BESCH: Radioimmunoassay;
Clin. Chem. 19 (1973) 146

VOELTER, W., FUCHS, S. und K. ZECH: Synthese von D-His^2-TRH, einem biologisch aktiven Analogon des Thyreotropin-freisetzenden Hormons (TRH);
Tetrahedron Letters 1974, 3975

WISLOCKI, G. B. and L. S. KING: The permeability of the hypophysis and hypothalamus to vital dyes with the study of the hypophyseal vascular supply;
Am. J. Anat. 58 (1936) 421 - 472

WISLOCKI, G. B.: The vascular supply of the hypophysis cerebri of the rhesus monkey and man;
Proc. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis. 17 (1938) 48 - 68

ZECH, K., HORN, H. und W. VOELTER: Synthese von (2-Phe)-TRH, ein bioaktives Analogon des Thyreotropin-freisetzenden Hormons (TRH);
Che. Ztg. 98 (1974a) 2o9

ZECH, K., HORN, H.,VOELTER, W., PUTTKAMER, K. v. and D. GUPTA: Synthesis and Biological Activity of the Tripeptide Pyr-Phe-Pro-NH_2. Abstract Book Hypothalamic Hormones:
Chemistry, Physiology, Pharmacology and Clinical Uses, Milan 62, 1974b

Herrn Prof. Dr. D. Gupta danke ich für die Überlassung des Themas und das stets bewiesene Interesse am Gelingen der Arbeit.

Herrn Dr. K. v. Puttkamer danke ich für die Einführung und die Hinweise bei den Experimenten.

LEBENSLAUF

Am 23. September 1951 wurde ich, Helmut Roland Hofmann, als Sohn des Walter Hofmann und seiner Ehefrau Maria, geb. Braun, in Nehdorf, Kreis Ansbach, geboren.

Nach dem vierjährigen Besuch der Grundschule in Wyhlen wechselte ich im Jahre 1962 auf das Gymnasium in Rheinfelden über. Dort legte ich am 24. Juni 197o das Abitur ab.

Am 1. Juli 197o begann mein Grundwehrdienst bei der Bundeswehr, der bis zum 3o. Juni 1971 dauerte.

Nach der Zulassung zum Studium der Zahnheilkunde in Tübingen immatrikulierte ich mich zum Wintersemester 1971/72.

Die naturwissenschaftliche Vorprüfung legte ich am 27. September 1972 und die zahnärztliche Vorprüfung am 4. April 1974 ab.

Am 8. Dezember 1976 schloß ich das Studium der Zahnheilkunde mit dem Staatsexamen ab.